

Instituto Cajal, CSIC
Dpto. de Neurobiología Molecular,
Celular y del Desarrollo

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Dpto. Anatomía, Histología y Neurociencia

TESIS DOCTORAL

Factores Extracelulares y células madre neurales: Efectos de FGF-2, EGF, IGF-I y Neurotrofinas durante la Neurogénesis y Sinaptogénesis

Vanesa Nieto Estévez

Madrid, Mayo 2013

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina

Dpto. Anatomía, Histología y Neurociencia

TESIS DOCTORAL

Factores extracelulares y células madre neurales: Efectos de FGF-2, EGF, IGF-I y Neurotrofinas durante la Neurogénesis y Sinaptogénesis

Vanesa Nieto Estévez

Instituto Cajal, CSIC
Departamento de Neurobiología Molecular, Celular y del Desarrollo
Madrid, Mayo 2013

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a Carlos por darme la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su laboratorio y por su dedicación en este tiempo.

A todas las personas que han pasado por el laboratorio estos años. Porque si vosotros todas las horas de trabajo hubieran sido mucho más duras. A Eva V. por la energía que transmite a todos cuando llega y porque hacer transplantes no hubiera sido lo mismo sin ella. A Héctor, por la ayuda que me ha dado siempre en temas científicos e informáticos, incluso ahora que está lejos. A Anahí, por pasarme el testigo del IGF-I y por su paciencia por enseñarme todo al principio. A Rosa por su ayuda inicial con los genotipajes y el criostato. A Carlos V. por esos paseos hasta la UAM y sus ganas de echar una mano siempre. A Jaime por aguantarme a su lado en el escritorio y en la poyata y enseñarme la parte más molecular. A Çağla por su ayuda con el inglés y en el labo (teşekkürler). A Eva D. porque ha sido un placer trabajar con ella, gracias por toda tu ayuda y por lo que me has enseñado en este tiempo. A Eva R. por su alegría contagiosa. A M^a José, porque no sé que hubiera hecho sin ella, gracias por toda tu ayuda, si no fuera por tí no me habría dado tiempo.

A todo el personal del Cajal por hacer que todo funcione. A Carmen, a Belén y a José Luis por la gran cantidad de horas que me han dado extras en el confocal y por su ayuda en la adquisición y análisis de imágenes. Al SBMC, a Silvia, Marina y Miguel por su ayuda con los genotipajes. A Noelia en el citómetro. Al personal del animalario por dejarme jaulas extras para poder criar a los ratones. Al grupo de Charo (Noelia, Sara, Irene, Ramiro...) por dejarme material y los momentos compartidos en el día a día y en congresos. A Carmen y Cris por todas esas horas en los cursos de doctorado.

A mis amigos porque de vez en cuando es bueno olvidar la ciencia. A Javi A., Javi S. y Isa por la cantidad de años que llevamos juntos. Al comité de sabios por esas escapadas al campo y no dejar que me olvide de la parte de bota de la biología.

A mi familia por estar ahí siempre. A mis padres porque sin ellos no sería como soy y no habría podido llegar hasta aquí. A mi hermana y a Jesús porque siempre me ayudan. A Iker por compartir conmigo todas sus mañanas, porque no se me ocurre una forma mejor de haber empezado cada día. A mis abuelos porque me han cuidado como unos padres. A mis tíos y primos, en especial a los que ya no están porque ellos despertaron mi vocación científica. A Sandra, Ramón, Jorge, María, Amalia y Domingo por su apoyo.

Y por último a Sergio, y no porque se lo merezca menos, por ser mi mayor apoyo siempre, sé que no te lo he puesto fácil, pero sin tí no lo habría conseguido. Gracias por seguir ahí.

Lista de abreviaturas

4E-BP1	inglés <i>eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1</i>
AP1	del inglés <i>activator protein-1</i>
AR	del inglés <i>amphiregulin</i>
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
Ascl1	del inglés <i>achaete-scute complex homolog 1</i>
BDNF	del inglés <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BLBP	del inglés <i>brain acid binding protein</i>
BO	Bulbo olfatorio
BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina
BTC	del inglés <i>betacellulin</i>
CA	Asta de Amón o <i>cornus ammonis</i>
CCG	Capa de células grano
CCM	Capa de células mitrales
CG	Capa glomerular
CM	Capa molecular
CMM	Corriente migratoria medial
CMN	Células madre neurales
CNO	Capa de nervios olfatorios
CPE	Capa plexiforme externa
CPI	Capa plexiforme interna
CREB	del inglés <i>DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with CreC</i>
DCX	doblecortina
E	Día embrionario
EGF	del inglés <i>epidermal growth factor</i>
EGFR	del inglés <i>epidermal growth factor receptor</i>
eIF2B	del inglés <i>eukaryotic initiation factor</i>
EO	Epitelio olfativo
ERK	del inglés <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
Ets	del inglés <i>endothelins</i>
FGF-2	del inglés <i>fibroblast growth factor 2</i>
FGFR	del inglés <i>fibroblast growth factor receptor</i>
FoxG1	del inglés <i>forkhead box G1</i>
FRS2	del inglés <i>fibroblast growth factor receptor substrate 2</i>
Gab	del inglés Grb2-associated binder
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GATA	del inglés <i>globin transcription factor</i>
GD	Giro dentado
GDP	del inglés <i>guanosine diphosphate</i>
GFAP	del inglés <i>glial fibrillary acidic protein</i>
GH	del inglés <i>Growth Hormone</i>
Grb2	del inglés <i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GTP	del inglés <i>guanosine triphosphate</i>
HB-EGF	<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>
Hes5	del inglés <i>hairly and enhancer of split 5</i>
Hi	<i>Hilus</i> o región hilar
HP	Hipocampo
IGFBP	del inglés <i>IGF binding proteins</i>
IGF-I	del inglés <i>insulin-like growth factor I</i>
IGF-IR	del inglés <i>insulin-like growth factor I receptor</i>
IPSC,	del inglés <i>induced pluripotent stem cells</i>
IRS	del inglés <i>insulin receptor substrate</i>
KO	Ratón carente o <i>knock-out</i>
LRP	del inglés <i>lipoprotein receptor-related protein</i>
MAP quinasa	del inglés <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAP2	del inglés <i>Microtubule-Associated Protein 2</i>
MKP3	del inglés <i>Mitogen-activated protein kinase phosphatase 3</i>
mTOR	del inglés <i>mammalian target of rapamycin</i>
NDF/HRG	del inglés <i>neu differentiation factor/hereregulin</i>
NeuN	del inglés, <i>Neuronal Nuclei</i>
NeuroD1	del inglés <i>neuronal differentiation 1</i>
Neurog2	neurogenina 2
NGF	del inglés <i>nerve growth factor</i>
NOS	Neuronas olfativas sensoriales
NRAGE	del inglés <i>neurotrophin receptor p75 interacting MAGE homologue</i>
NRIF	del inglés <i>neurotrophin receptor-interacting factor</i>

NT-3	del inglés <i>neurotrophin 3</i>
NT-4	del inglés <i>neurotrophin 4</i>
P	Día postnatal
p75NTR	receptor de neurotrofinas p75
Pax6	del inglés <i>paired box 6</i>
PI3K	del inglés <i>phosphatidylinositol 3 kinase</i>
PLC γ	fosfolipasa C γ
Prox1	del inglés <i>prospero homeobox 1</i>
PSA-NCAM	del inglés <i>polysialylated form of neural cell adhesion molecule</i>
REST	del inglés <i>RE1-silencing transcription factor</i>
SC1	del inglés <i>Schwann cell factor 1</i>
SH2	del inglés <i>Src homology 2</i>
Shc	del inglés <i>SH2 containing domain</i>
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
SOS	del inglés <i>son of sevenless</i>
Sox	del inglés <i>SRY,sex determining region Y,-box</i>
Tbr1 y Tbr2	del inglés <i>T-box brain 1 and 2</i>
TGF α	del inglés <i>transforming growth factor α</i>
TH	Tirosina hidroxilasa
TLX	del inglés <i>transcription factor protein</i>
TOL	Tracto olfatorio lateral
Traf6	del inglés <i>TNF receptor-associated factor 6</i>
Trk	del inglés <i>tropomyosin-related kinase</i>
TuJ1	isoforma III de la β tubulina
WT	Ratón salvaje o <i>wildtype</i>
ZI	Zona intermedia
ZMa	Zona del manto
ZSE	Zona subependimal
ZSG	Zona subgranular
ZSV	Zona subventricular
ZV	Zona ventricular

Índice

Introducción

1. Breve introducción al desarrollo del sistema nervioso	3
2. Neurogénesis.....	3
2.1. Neurogénesis embrionaria	3
2.2. Neurogénesis adulta.....	4
3. Neurogénesis en la Zona subventricular-Bulbo olfatorio	5
3.1. Zona subventricular.....	5
3.2. Corriente migratoria rostral	7
3.3. Bulbo olfatorio.....	7
3.3.1. Desarrollo y estructura del bulbo olfatorio.....	8
4. Formación, estructura y función del hipocampo	10
4.1. Desarrollo embrionario y postnatal del hipocampo	10
4.2. Neurogénesis hipocampal adulta.....	13
4.3. Estructura y fisiología del HP.....	14
5. Factores que regulan la neurogénesis	15
5.1. Factores de crecimiento.....	16
5.1.1. FGF-2	16
5.1.2. EGF.....	20
5.1.3. IGF-I	22
5.2. Neurotrofinas	29
5.2.1. Expresión de BDNF y NT-3.....	31
5.2.2. Vías de señalización.....	31
5.2.3. Funciones de BDNF y NT-3	31

Objetivos

Material y Métodos

1. Líneas de ratones empleadas y mantenimiento	41
1.1. Ratones transgénicos	41

1.1.1.	Ratón <i>Knock-Out</i> global para IGF-I	41
1.1.2.	Ratón <i>Knock-out</i> condicional para IGF-I	42
1.1.3.	Ratones GFP.....	45
1.2.	Ratones salvajes (no modificados genéticamente)	45
1.2.1.	Cepa MF1	45
1.2.2.	Cepa C57Bl/6N.....	45
1.2.3.	Cepa CD1	46
1.3.	Genotipaje	46
2.	Estudios en cultivos celulares o <i>in vitro</i>	48
2.1.	Disección.....	48
2.2.	Obtención de células madre neurales de BO embrionario	49
2.3.	Obtención de células madre neurales de BO e HP postnatal y adulto.....	50
2.4.	Mantenimiento de células madre neurales	50
2.5.	Cultivos en proliferación de CMN.....	51
2.5.1.	Cultivos en adhesión.....	51
2.5.2.	Cultivos en flotación	51
2.5.3.	Análisis clonal	51
2.6.	Cultivos en diferenciación de CMN	52
2.6.1.	Diferenciación a corto plazo	52
2.6.2.	Diferenciación a largo plazo	52
2.7.	Cultivo de neuronas.....	53
2.8.	Inmunocitoquímica.....	55
2.9.	Estudios de proliferación y ciclo celular	56
2.10.	Estudios de muerte celular.....	57
2.11.	Contajes celulares.....	58
2.12.	Cultivo de fibroblastos.....	59
2.13.	Cultivo de células de hígado	59
3.	Estudios <i>in vivo</i>	60
3.1.	Marcaje de células proliferativas <i>in vivo</i>	60
3.1.1.	Producción de partículas retrovirales.....	60

3.1.2.	Inyección de partículas retrovirales	62
3.2.	Perfusión de los animales.....	63
3.2.1.	Procesamiento del tejido para su corte en vibratomo	63
3.2.2.	Procesamiento del tejido para su corte en criostato	64
3.3.	Tinción de Nissl.....	64
3.4.	Inmunohistoquímica	64
3.5.	Tinción TUNEL	66
3.6.	Análisis realizados en secciones de tejido.....	66
3.6.1.	Contajes celulares	66
3.6.2.	Estimación del volumen y el área.....	66
3.6.3.	Cuantificación de marcadores moleculares de sinapsis.....	67
3.6.4.	Estudio morfológico y de migración.....	67
4.	Técnicas moleculares	68
4.1.	<i>Western blot</i> (Electrotransferencia).....	68
4.1.1.	Lisis y cuantificación de proteínas.....	68
4.1.2.	Electroforesis y transferencia.....	68
4.1.3.	Inmunodetección de las proteínas.....	69
4.2.	Análisis de expresión génica.....	70
4.2.1.	Extracción y purificación de ARNm	70
4.2.2.	Análisis de expresión génica en microarrays (micromatrices de ADN).....	70
4.2.3.	Procesamiento de los datos	71
4.2.4.	Análisis de ontologías genéticas (<i>Gene ontology enrichment analysis</i>).....	71
4.2.5.	Diagramas de dispersión (<i>Pairwise scatter plots</i>)	71
4.2.6.	Análisis de vías de señalización KEGG (<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>)	72
4.2.7.	RT-PCR cuantitativa a tiempo real.....	72
5.	Análisis estadístico	74

Resultados

1.	Papel de FGF-2 y EGF en el mantenimiento y supervivencia de las CMBO	77
----	--	----

1.1.	Efecto de FGF-2 y EGF en la proliferación y muerte celular de CMBO	77
1.1.1.	Análisis de la proliferación celular y estado indiferenciado en cultivos en flotación	77
1.1.2.	Estudios de ciclo celular.....	79
1.1.3.	Estudios de muerte celular	83
1.2.	Análisis de la multipotencialidad de las CMBO en análisis poblacional	88
1.3.	Mecanismos moleculares implicados de la supervivencia e inicio de la diferenciación de CMBO	88
1.3.1.	Expresión de <i>Fgf-2</i> , <i>Egf</i> y sus receptores en CMBOa y CMBOe.....	88
1.3.2.	Análisis global de la expresión génica	91
2.	Papel de BDNF y NT-3 en la maduración morfológica y sináptica de neuronas derivadas de CMBOe	99
2.1.	Expresión de TrkB y TrkC en el BO embrionario.....	99
2.2.	Efecto de BDNF y NT-3 en la maduración de neuronas derivadas de CMBOe.....	100
2.2.1.	Neuronas GABAérgicas	101
2.2.2.	Neuronas dopaminérgicas.....	102
2.2.3.	Neuronas glutamatérgicas.....	106
2.3.	Efecto de BDNF y NT-3 en la maduración sináptica neuronal.....	107
3.	Función del IGF-I durante la sinaptogénesis embrionaria del BO y del HP	108
3.1.	Papel de IGF-I en la sinaptogénesis del BO embrionario	108
3.2.	Papel de IGF-I en la sinaptogénesis del HP embrionario.....	111
4.	Función de IGF-I durante la neurogénesis hipocampal postnatal y adulta	113
4.1.	Expresión de IGF-I e IGF-IR en el HP	115
4.1.1.	Expresión de IGF-I en el GD del HP	115
4.1.2.	Expresión de IGF-IR en el GD del HP.....	118
4.2.	Fenotipo macroscópico del ratón KO para IGF-I y análisis del tamaño del GD	118
4.3.	Papel de IGF-I durante la proliferación celular <i>in vivo</i>	121
4.4.	Efecto de IGF-I en la proliferación y autorrenovación celular <i>in vitro</i>	123
4.5.	Papel de IGF-I durante la formación de neuronas a partir de CMN <i>in vivo</i>	126
4.5.1.	Efecto de IGF-I en células madre del hipocampo	128
4.5.2.	Papel de IGF-I en progenitores, neuronas inmaduras y neuronas grano.....	129

4.6. Papel de IGF-I en la migración y maduración neuronal <i>in vivo</i>	136
4.7. Análisis de algunos mecanismos moleculares que pudieran estar implicados en el efecto de la falta de IGF-I en el GD	138
4.8. Generación y análisis del ratón Nestina-Cre: <i>Igf-I</i>	140
4.8.1. Análisis de las líneas de ratones <i>Igf-I</i> loxP y Nestina-Cre	141
4.8.2. Fenotipo macroscópico e histológico del ratón <i>Igf-I</i> ^{Δ/Δ}	144
4.8.3. Análisis de la proliferación y del linaje neuronal en el GD de ratones <i>Igf-I</i> ^{Δ/Δ} ..	149

Discusión

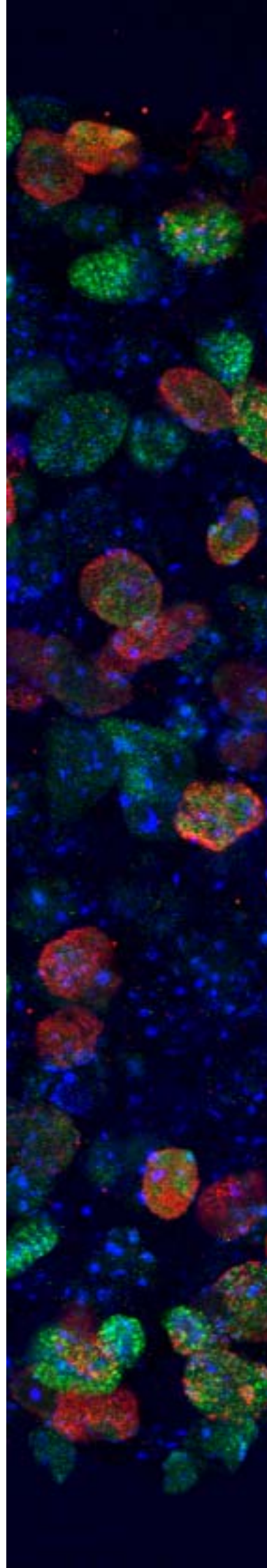
1. Efecto de FGF-2 y EGF en el mantenimiento y supervivencia de células madre neurales	161
1.1. Mecanismos celulares y moleculares asociados a la muerte y la protección celular inducidos por la falta parcial de FGF-2 y EGF	161
1.2. Inicio de la diferenciación celular en respuesta al ayuno parcial de FGF-2 y EGF: mecanismos moleculares	163
2. Papel de BDNF y NT-3 en la maduración de las neuronas derivadas de CMBOe	164
2.1. Efecto de BDNF y NT-3 en la maduración morfológica	165
2.2. Efecto de BDNF y NT-3 en la formación y maduración de sinapsis.....	166
3. Efecto de IGF-I durante la sinaptogénesis embrionaria en el BO y el HP	168
4. Papel de IGF-I durante la neurogénesis hipocampal postnatal-adulta	171
4.1. Efecto de IGF-I en el HP de ratones postnatal-adulto	171
4.2. Efecto de IGF-I en la proliferación celular en el GD	172
4.3. Efecto de IGF-I sobre la población de células madre y progenitores en el GD	173
4.4. Efecto de IGF-I sobre la diferenciación neuronal en el GD	174
4.5. Mecanismos implicados en el efecto de IGF-I durante la neurogénesis adulta	175
4.6. Generación de la línea de ratones Nestina-Cre: <i>Igf-I</i>	177

Conclusiones

Bibliografía

Anexo

Introducción



1. Breve introducción al desarrollo del sistema nervioso

Una vez finalizado el proceso de gastrulación por el cual se originan las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo), comienza la organogénesis. El sistema nervioso (SN) es un derivado de la capa ectodérmica. La notocorda induce el engrosamiento del ectodermo (neuroectodermo) formando la placa neural, y, posteriormente, su invaginación da lugar al tubo neural a partir del cual se originará el sistema nervioso central (SNC). La parte caudal del tubo neural formará la médula espinal y la zona rostral, el encéfalo. Además, del punto de fusión del tubo se originan grupos de células, denominadas células de la cresta neural, que darán lugar al SN periférico.

El neuroectodermo, en este punto del desarrollo, es un epitelio pseudoestratificado formado por células neuroepiteliales que se dividen simétricamente para aumentar su número. Debido a que la tasa de proliferación no es uniforme a lo largo del tubo neural, se forman tres vesículas en la parte rostral: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el romboencéfalo. En estadios más avanzados del desarrollo, el prosencéfalo se subdivide en el telencéfalo y el diencéfalo, y el romboencéfalo, en el metencéfalo y el mielencéfalo (Kandel et al. 2013). Cada una de estas regiones originará las distintas partes del SNC maduro.

En esta tesis hemos centrado nuestro estudio en el bulbo olfatorio y el hipocampo, ambas estructuras telencefálicas.

2. Neurogénesis

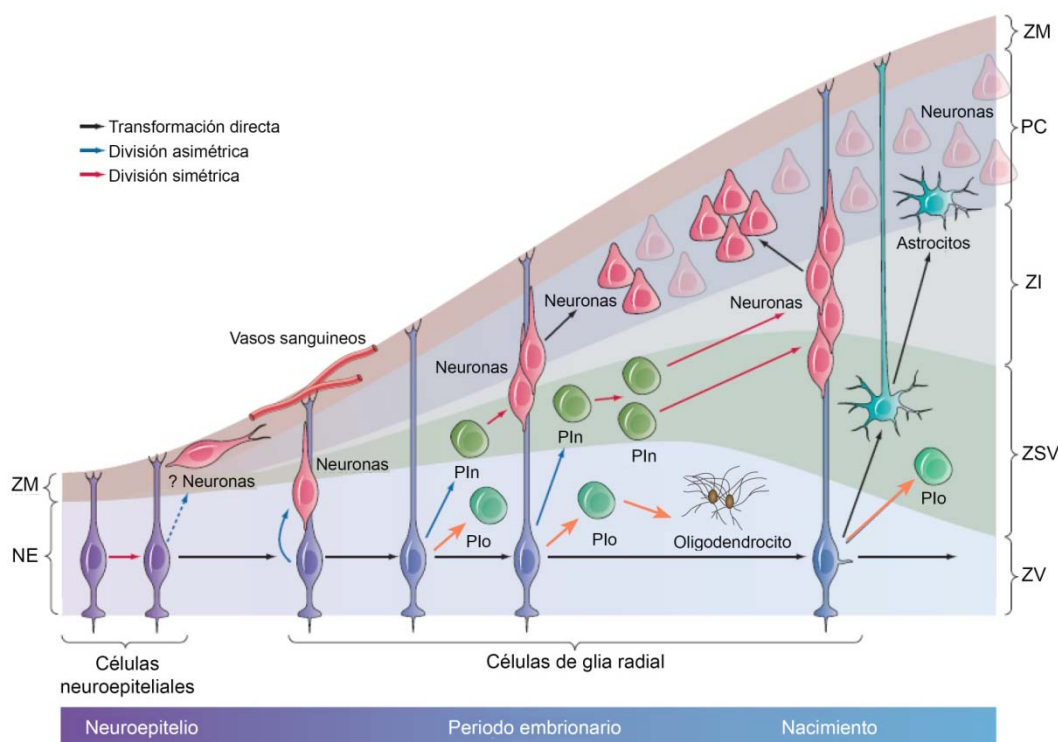
En sentido amplio, la neurogénesis se define como el conjunto de eventos que conducen a la producción de neuronas desde células progenitoras en división hasta su maduración en las distintas estructuras cerebrales.

2.1. Neurogénesis embrionaria

En estadios tempranos de desarrollo, las células neuroepiteliales pueden formar las primeras neuronas del SN (Kriegstein y Alvarez-Buylla 2009). Según se engrosa el neuroepitelio, sobre el día E9-10 del desarrollo del ratón, las células se elongan, manteniendo el contacto con la superficie externa (pial) e interna (ventricular) del neuroepitelio, y van adquiriendo características de células gliales, por lo que se denominan células de glía radial (Anthony et al. 2004). Estas células pueden dividirse asimétricamente dando lugar a otra célula igual y a una célula diferenciada directamente, o más frecuentemente, a través de un progenitor intermedio (Fig. 1). Por tanto, las células neuroepiteliales y las células de glía radial constituyen las primeras células madre neurales (CMN), también denominadas células progenitoras primarias o progenitores primarios (Kriegstein y Alvarez-Buylla 2009).

Se define una célula madre (del inglés *stem cell*) como aquella célula indiferenciada con capacidad de autorrenovación, es decir, de dar lugar, al menos, a una célula con características de célula madre, y de diferenciarse a múltiples tipos celulares. Las CMNs son células multipotentes ya que pueden generar los tres tipos de células nerviosas: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (McKay 1997; Gage 2000; Temple 2001). Estas características de autorrenovación y multipotencialidad de las CMNs se han demostrado ampliamente *in vitro* en cultivos clonales (a partir

de células únicas) (Gritti et al. 1996; Johe et al. 1996; Reynolds y Weiss 1996; Temple 2001; Vicario-Abejón et al. 2003; Vergaño-Vera et al. 2009; Pastrana et al. 2011), y, recientemente, también *in vivo* (Noctor et al. 2001; Bonaguidi et al. 2011).



Modificado de Kriegstein y Alvarez-Buylla 2009

Figura 1: Representación esquemática de la neurogénesis embrionaria. En el dibujo se ilustra resumidamente la formación de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos durante el desarrollo embrionario a partir de las células neuroepiteliales y de células de glía radial, las cuales poseen características de célula madre neurales o progenitores primarios. NE=neuroepitelio; PC=placa cortical; PIn=progenitor intermedio neuronal; Plo=progenitor intermedio de oligodendrocitos; ZI=zona intermedia; ZM=zona marginal; ZSV=zona subventricular; ZV=zona ventricular.

En la corteza cerebral de roedor, los progenitores intermedios neuronales poblarán la ZSV embrionaria y las nuevas neuronas migrarán a través de las fibras de glía radial hasta alcanzar su posición final (Noctor et al. 2004). Estas nuevas neuronas formarán la gran diversidad celular que existe en el SNC a través de mecanismos celulares intrínsecos en los que influye la subregión de la zona ventricular de origen y el momento del desarrollo, debido, en parte, a la expresión de factores de transcripción y mecanismos epigenéticos (Qian et al. 2000; Weinandy et al. 2011).

A partir de las células de glía radial, también se originan progenitores de astrocitos y de oligodendrocitos que darán lugar a los distintos tipos de células gliales maduras (Fig.1), así como a las células tipo B (ver apartado 3.1).

2.2. Neurogénesis adulta

En algunas regiones del cerebro postnatal y adulto se ha descrito la presencia de CMN a lo largo de toda la vida del individuo (Taupin y Gage 2002; Duan et al. 2008). Estas regiones son: la ZSV de la pared del ventrículo lateral (Lois y Alvarez-Buylla 1993; Doetsch et al. 1999) y la zona

subgranular (ZSG) del giro dentado (GD) del hipocampo (HP) (Kaplan y Bell 1984; Cameron et al. 1993; Gage 2000). Ambas zonas neurogénicas suponen un aporte continuo de nuevas neuronas en el bulbo olfatorio (BO) y en el GD de roedores. Sin embargo, en humanos la incorporación de nuevas neuronas en el BO después del nacimiento es muy baja, $<0,01\%$ (Bergmann et al. 2012). Algunos autores además han propuesto otro nicho neurogénico dentro del BO, independiente de la ZSV (Höglinger et al. 2004; Giachino y Taylor 2009; Vergaño-Vera et al. 2009; Moreno-Estelles et al. 2012).

Los primeros trabajos sobre neurogénesis adulta se publicaron en 1965, cuando se describió la presencia de células que incorporaban timidina tritiada en algunas regiones del cerebro de roedores (Altman y Das 1965), pero no fue hasta la década de los 90, con el desarrollo de nuevas tecnologías, cuando se produjeron grandes avances en este tema (Doetsch et al. 1999; Zhao et al. 2006; Manganas et al. 2007). Hasta la fecha se han encontrado CMN en el cerebro adulto de la mayoría de los grupos de vertebrados como peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (incluyendo primates no humanos y humanos) (Alvarez-Buylla y Lois 1995; Eriksson et al. 1998; Quiñones-Hinojosa et al. 2006; Kempermann 2012).

A continuación, se hace una revisión más detallada de la neurogénesis en la ZSV (apartado 3.1-2) y del GD (apartado 4).

3. Neurogénesis en la Zona subventricular-Bulbo olfatorio

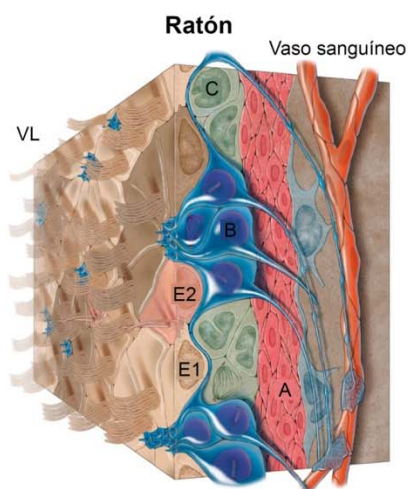
3.1. Zona subventricular

En ratones adultos, las CMN, denominadas células B, se localizan en la ZSV de la pared lateral y medio anterior del tercer ventrículo, por encima de las células endodiales. Estas células endodiales rodean a las células B con un patrón específico que se asemeja a un molinete. Las células B se caracterizan por poseer un único cilio pequeño en contacto con el ventrículo y un largo proceso basal que termina en un vaso sanguíneo. Por el contrario, la mayoría de las células endodiales son multiciliadas (células E1), aunque también se han descrito células biciliadas (células E2) recubriendo el ventrículo (Fig. 2 A). Las células B son CMN quiescentes que pueden dar lugar a progenitores de amplificación, denominados células C, con una alta capacidad de proliferación. Las células tipo C originarán neuroblastos (células A) que migrarán formando cadenas a través de la corriente migratoria rostral (CMR) hasta el BO, donde se diferenciarán a interneuronas. En ratones, más de 30.000 neuroblastos salen de la ZSV cada día (Lledo et al. 2006; Mirzadeh et al. 2008; Fuentealba et al. 2012). Las células B, también pueden dar lugar, aunque en mucho menor número, a astrocitos y oligodendrocitos a través de progenitores intermedios (Kriegstein y Alvarez-Buylla 2009).

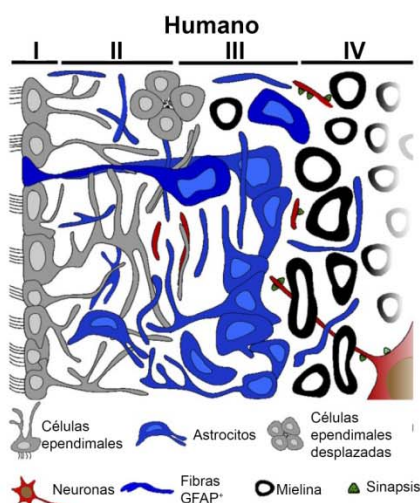
Al igual que ocurre durante la neurogénesis embrionaria, la ZSV adulta se divide en dominios, y dependiendo de la región de la ZSV de origen, las células B darán lugar a un tipo de neuronas u otro (Kelsch et al. 2007; Merkle et al. 2007). La gran mayoría de las células formadas serán neuronas grano, GABAérgicas, de axón corto que harán sinapsis dendro-dendríticas con las células mitrales y empenachadas. Una minoría dará lugar a neuronas periglomerulares GABAérgicas, entre las que hay un pequeño porcentaje que es dopaminérgico. Además, un todavía menor porcentaje de las nuevas

células formarán neuronas juxtaglomerulares glutamatérgicas (Merkle et al. 2007; Lledo et al. 2008; Brill et al. 2009; Weinandy et al. 2011).

A

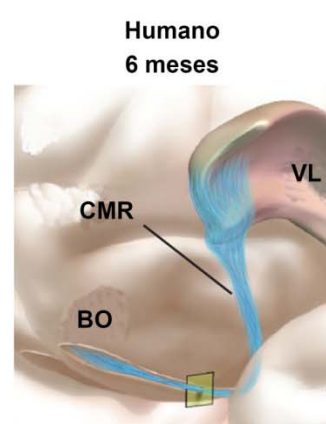


Mirzadeh et al. 2008



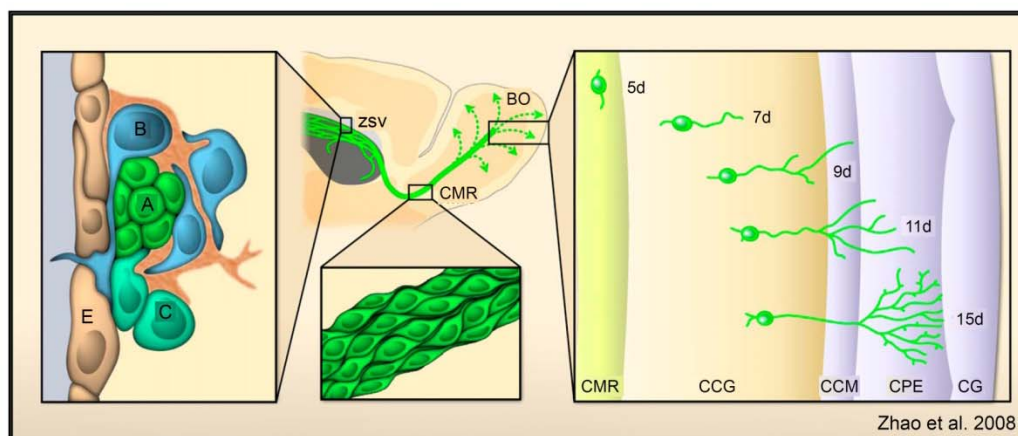
Quiñones-Hinojosa et al. 2006

B



Sanai et al. 2011

C



Zhao et al. 2008

Figura 2: Esquema del nicho de CMN y de la neurogénesis adulta en la ZSV-BO. (A) Los dibujos muestran una representación de la estructura del nicho donde se encuentran las CMN (células tipo B) en la ZSV de ratón y humanos adultos. En el ratón, las células B se encuentran rodeadas por las células endodiales (células E1 y E2) formando una organización en molinete. Las células B dan lugar a progenitores de amplificación (células tipo C) que originarán neuroblastos o neuronas inmaduras (células A), las cuales migrarán formando cadenas a través de la CMR **(B)** Ilustración de la CMR en humanos de 6 meses. Esta corriente quedará reducida a células aisladas en individuos adultos. **(C)** Origen y migración de los neuroblastos desde la ZSV hasta formar las nuevas neuronas en las distintas capas del BO. BO=bulbo olfatorio; CCM=capa de células mitrales; CCG=capa de células grano; CG=capa glomerular; CMR=corriente migratoria rostral; CPE=capa plexiforme externa; d=día; VL=ventrículo lateral; ZSV=zona subventricular.

En humanos, la organización celular en la ZSV difiere de lo descrito para ratones (Sanai et al. 2004; Quiñones-Hinojosa et al. 2006). En el momento del nacimiento, la ZSV humana conserva una estructura similar a la del periodo embrionario, formada por células de glía radial alargadas rodeadas de células uni y bipolares orientadas perpendicularmente al ventrículo. Entre los 6 y 18 meses de vida, esta organización cambia drásticamente hasta adquirir la distribución en cuatro capas presente

en la ZSV adulta (Fig. 2 A). El cuerpo celular de los astrocitos, que probablemente se correspondan con las CMNs, se localizan en la capa III y sólo contactan con el ventrículo mediante algún proceso citoplasmático.

3.2. Corriente migratoria rostral

Los neuroblastos generados en la ZSV de ratones migran unos 5 mm hasta el BO a través de la CMR. Esta corriente está formada por cadenas de células A que poseen una estructura alargada con un proceso líder. La polimerización y depolimerización de los microtúbulos de las células A es crítica durante el proceso de migración. En estudios *in vitro*, se ha estimado que la velocidad media de migración de células A es 120 $\mu\text{m}/\text{h}$ (Wichterle et al. 1997). Envolviendo a las cadenas de células A, se encuentran células gliales, con características de astrocitos, que mantienen el contacto con vasos sanguíneos. La migración está regulada por factores secretados por los astrocitos, así como factores de la matriz extracelular entre los que se incluyen factores quimioatrayentes y de repulsión. Además, también afecta a la migración las interacciones célula-célula (Alvarez-Buylla y García-Verdugo 2002; Mu et al. 2010; Sun et al. 2010; Faigle y Song 2012).

Miles de neuroblastos llegan al BO de ratones cada día, aunque no todos sobreviven (Lledo et al. 2008; Mu et al. 2010). Una vez allí, los neuroblastos migran radialmente hasta diferenciarse en las distintas neuronas que poblarán las capas del BO (Fig. 2 C).

Ha existido una gran controversia sobre la existencia de una CMR en humanos (Weickert et al. 2000; Sanai et al. 2004; Curtis et al. 2007; Sanai et al. 2007). Actualmente, se ha descrito la presencia de una corriente migratoria hasta los seis primeros meses de vida (Fig. 2 B). Por el contrario, en adulto sólo se han encontrado neuroblastos TuJ1^+ (isoforma III de la β tubulina) o PSA-NCAM^+ (del inglés *polysialylated form of neural cell adhesion molecule*) con morfología migratoria de manera individual sin formar cadenas (Sanai et al. 2011; Wang et al. 2011).

Además, en los 6 primeros meses después del nacimiento, se ha descrito una corriente migratoria medial (CMM), por la que grupos de células migran hasta una subregión de la corteza prefrontal humana (Sanai et al. 2011).

3.3. Bulbo olfatorio

El BO forma parte del sistema olfativo que está constituido por dos sistemas quimiosensoriales: el sistema olfativo y el sistema vomeronasal. El sistema olfativo se encarga de la detección de olores y está compuesto por el epitelio olfativo (EO), el BO y la corteza olfativa. El sistema vomeronasal está compuesto por el órgano vomeronasal y el BO accesorio, encargados de detectar feromonas, relacionadas, principalmente, con el comportamiento sexual y el reconocimiento de la progenie (Chamero et al. 2012).

El BO de ratón se encuentra localizado en la parte más rostral del telencéfalo mientras que en humanos se localiza por debajo de los hemisferios cerebrales y es de menor tamaño comparado con el tamaño cerebral (Fig. 3 A).

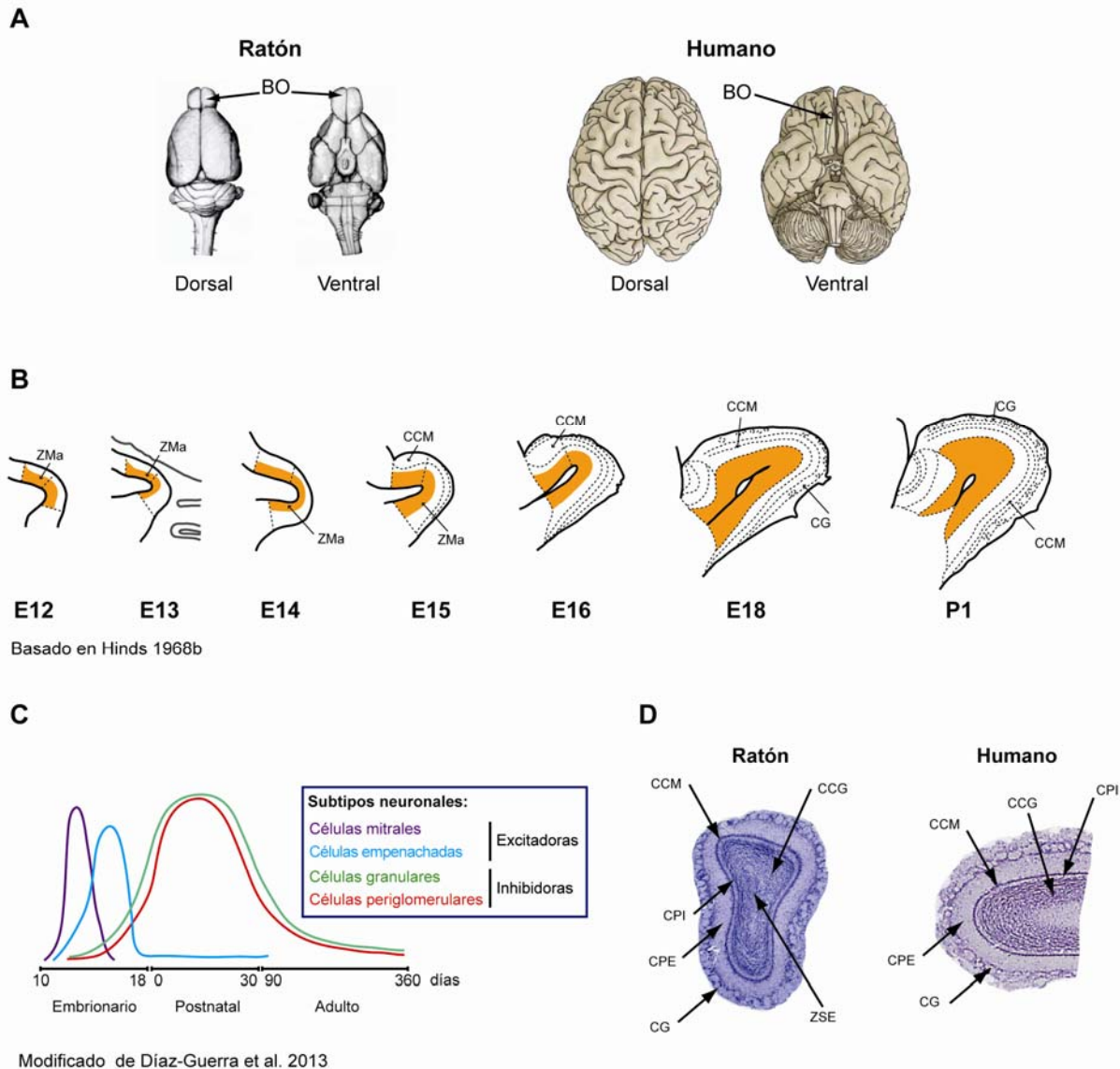


Figura 3: Desarrollo y estructura del BO de ratón y humano. (A) Los dibujos muestran la localización de los BOs en el cerebro de ratón y humano. En el caso del ratón, el BO se sitúa en la parte más rostral del encéfalo, mientras que en humanos se encuentran por debajo de los hemisferios cerebrales. (B) Esquema del desarrollo embrionario del BO de ratón. A la edad E13 ya es distinguible el BO como una evaginación del neuroepitelio. Este edad fue la elegida para obtener CMBOe. (C) El gráfico muestra los periodos de generación de los principales subtipos de neuronas del BO durante el desarrollo embrionario y la edad adulta. (D) Imágenes de violeta de cresilo de secciones de BO de ratón (coronal) y humano (sagital) adulto, en el que se pueden distinguir las distintas capas que lo componen. BO=bulbo olfatorio; CCM=capa de células mitrales; CCG=capa de células grano; CG=capa glomerular; CPE=Capa plexiforme externa; CPI=Capa plexiforme interna; ZMa=zona del manto; ZSE=zona subependimal.

3.3.1. Desarrollo y estructura del bulbo olfatorio

En ratones, el día 12 de su desarrollo embrionario (E12) se produce un engrosamiento en la parte rostral del telencéfalo que se evagina (Fig. 3 B). En ese momento el primordio del BO está formado por dos capas: la zona ventricular (ZV), compuesta por células proliferativas orientadas radialmente; y la zona del manto (ZMa), en la que se disponen células postmitóticas (Hinds 1968a; Hinds 1968b; Bailey et al. 1999). Entre E13 y E14, los BO tienen una forma bulbar, visible

macroscópicamente, y se distinguen dos nuevas capas entre ZV y la ZMa: la zona subependimal (ZSE) o subventricular, que contiene una densa población de células proliferativas; y la zona intermedia (ZI), formada por células en migración y diferenciación. La capa de las células mitrales (CCM) irá remplazando a la ZMa (Bailey et al. 1999).

Los primeros axones de las neuronas olfativas sensoriales (NOS) penetran hasta la zona donde se formarán los glomérulos y formarán la capa glomerular (GL). A E15, se empieza a distinguir la organización radial del BO y la ZMa más interna se empieza a diferenciar en la capa de células grano (CCG) y la CCM está formada por varias líneas de células. Se empieza a distinguir una capa entre la CCG y la CCM que será la futura capa plexiforme interna (CPI) y por encima de la CCM, se distingue otra capa acelular que será la futura capa plexiforme externa (CPE) (Bailey et al. 1999). A E16, los primordios de los glomérulos empiezan a ser reconocibles (Blanchart et al. 2008) y la CPE irá engrosándose. Al final del desarrollo embrionario, en E18, la ZV desaparece y la mayoría de las células del manto son reemplazadas por células grano. En el momento del nacimiento, el BO está formado por las mismas capas que en adulto (Fig. 3 B y D). Las neuronas mitrales y empenachadas excitadoras, ambas glutamatérgicas, expresan los factores de transcripción *Tbr1* (del inglés *T-box brain 1*) y *Tbr2* (del inglés *T-box brain 2* o *Eomes*) (Hurtado-Chong et al. 2009; Mizuguchi et al. 2012). Entre las neuronas inhibitoras hay múltiples subtipos reconocibles por la expresión de GABA (ácido γ -aminobutírico), calretinina, calbindina, parvalbúmina y TH (tirosina hidroxilasa) (Vergaño-Vera et al. 2006; Allen et al. 2007; Bagley et al. 2007; Parrish-Aungst et al. 2007; Kosaka y Kosaka 2008; Hurtado-Chong et al. 2009; Kosaka y Kosaka 2009; Winpenny et al. 2011).

Los distintos tipos de neuronas que componen el BO se van formando en distintos momentos del desarrollo. Las primeras neuronas en formarse en el BO de ratón son las de proyección (células mitrales y empenachadas) (Hinds 1968a; Hinds 1972a; Hinds 1972b; Lopez-Mascaraque y de Castro 2002; Blanchart et al. 2006; Weinandy et al. 2011; Díaz-Guerra et al. 2013). Entre el día E10 y E15, las células mitrales se forman a partir de células progenitoras de glía radial localizadas en la ZV. Las células empenachadas se originan principalmente entre E12 y E18 aunque algunas se forman postnatalmente. Sin embargo, las interneuronas se forman, principalmente, en estadios más tardíos del desarrollo embrionario y continúa su incorporación posnatalmente. Durante el desarrollo embrionario, la mayoría de las interneuronas se originan en la eminencia glanglionar lateral, aunque algunas interneuronas GABAérgicas y dopamiérgicas se forman en el propio BO (Vergaño-Vera et al. 2006). Además, en el septum también se originan interneuronas del BO, entre las que se incluyen células calretinina (Long et al. 2003; Kohwi et al. 2007). Por otro lado, en la edad adulta las interneuronas se producen en la ZSV (Lois y Alvarez-Buylla 1993) y, quizá también en el propio BO (Giachino y Taylor 2009; Vergaño-Vera et al. 2009; Moreno-Estelles et al. 2012; Díaz-Guerra et al. 2013) (Fig. 3 C).

Las nuevas neuronas que se forman en la edad adulta se incorporan en el circuito existente e irán desarrollando espinas dendríticas de manera progresiva. La supervivencia de estas neuronas, el establecimiento de las espinas dendríticas (formación y eliminación) y su integración en el circuito preexistente depende de la actividad neuronal, entre otros factores (Lledo et al. 2008; Díaz-Guerra et al. 2013). La incorporación de estas nuevas neuronas parece ser beneficiosa para la plasticidad

neuronal, la discriminación de olores y la memoria olfativa (Gheusi et al. 2000; Lazarini y Lledo 2011; Alonso et al. 2012).

En humanos, en la semana 16 de gestación, el BO presenta un claro ventrículo y se divide en cuatro zonas: una zona celular periventricular (la ZV y la ZSV), una zona intermedia con una alta densidad celular, una zona marginal y una zona con células alargadas (la futura CCM). En la semana 20-22, el ventrículo persiste en la zona caudal y se puede observar la zona de formación de los glomérulos. A partir de la semana 30, los centros olfativos primarios empiezan a ser funcionales. En el momento del nacimiento, el ventrículo está prácticamente cerrado y todas las capas que forman el BO adulto son visibles (Kharlamova et al. 2010; Sanai et al. 2011).

4. Formación, estructura y función del hipocampo

La formación hipocampal está constituida por el Asta de Ammón (o *cornus ammonis*, CA), el GD, la fimbria, la área entorrinal y el subículo; y está encargada del aprendizaje y la memoria, así como del comportamiento afectivo, por lo que se engloba dentro del sistema límbico.

En humanos se localiza en el lóbulo temporal cerca de la base del cerebro, mientras que en roedores se localiza más dorsalmente debido al menor desarrollo de la corteza (Fig. 4) (Kempermann 2012; Kandel et al. 2013).

4.1. Desarrollo embrionario y postnatal del hipocampo

El HP se forma a partir del neuroepitelio de la parte dorsomedial de la vesícula telencefálica (Altman y Bayer 1990b). Entre los días E16-17 del desarrollo de la rata se empiezan a formar las neuronas piramidales y en el neuroepitelio se distinguen tres regiones germinales: el neuroepitelio de Ammón, el neuroepitelio dentado y el neuroepitelio fimbrial (Altman y Bayer 1990b). A E18, por encima del neuroepitelio de Ammón se distingue una zona de migración celular (zona de migración de Ammón), que contiene las neuronas del *stratum radiatum*, y la futura capa de células piramidales. Por encima del neuroepitelio dentado primario, se observa la matriz dentada secundaria (Altman y Bayer 1990b). A E19, se produce un engrosamiento de la zona de migración de Ammón, de la capa de células piramidales y de la fimbria.

Entre los días E20-21, se reducen los neuroepitelios de Ammón, dentado primario y fimbrial. El número de células proliferativas en la matriz dentada secundaria aumenta, se visualiza una migración dentada masiva desde la matriz secundaria hacia la cresta del GD y se empieza a distinguir la hoja dorsal y ventral del mismo. Debido al crecimiento en la capa de células piramidales, la zona del Asta de Ammón se comienza a curvar hacia el GD (Fig. 5 A) (Altman y Bayer 1990b; Altman y Bayer 1990a). El día antes del parto (E22), aumenta el grosor de la capa de células piramidales. Las células de la hoja dorsal del GD presentan morfologías más maduras que las de la hoja ventral (Fig. 5 A) (Altman y Bayer 1990b).

Un día después del nacimiento (día postnatal, P1), la hoja ventral del GD se incrementa en grosor y en longitud aunque, aún a P3-P5, sus células presentan una morfología menos diferenciada que las de la hoja dorsal (Fig. 5 A) (Altman y Bayer 1990a). A P2, se empieza a distinguir una tercera zona de proliferación entre la hoja dorsal y ventral del GD (matriz dentada terciaria). Diez días

después del nacimiento (P10), se ha producido un gran incremento en la población de neuronas grano que presentan morfologías maduras en las dos hojas del GD. Las células proliferativas de la matriz dentada terciaria van ocupando la ZSG, quedando a P30 reducidas a esa zona (Altman y Bayer 1990a) (Fig. 5 A).

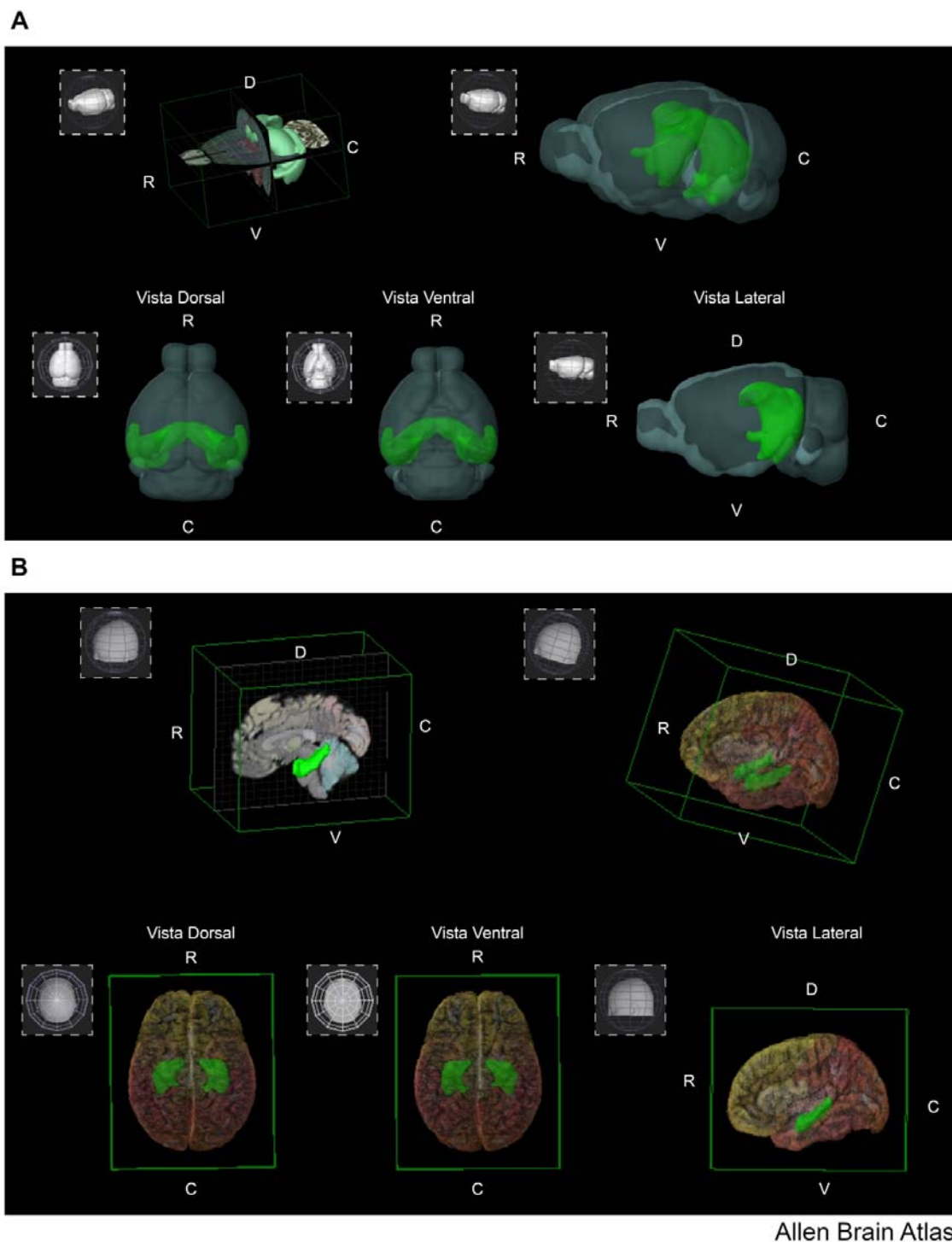
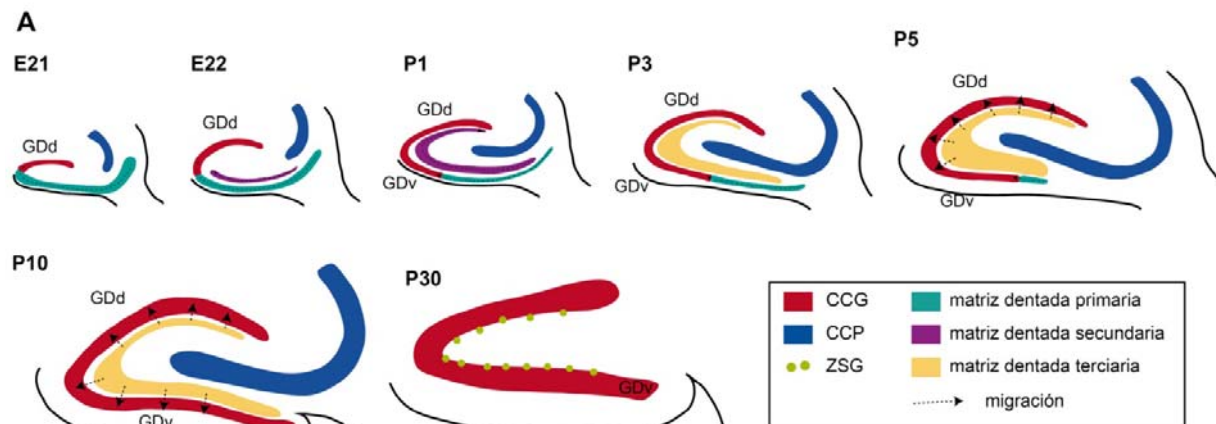
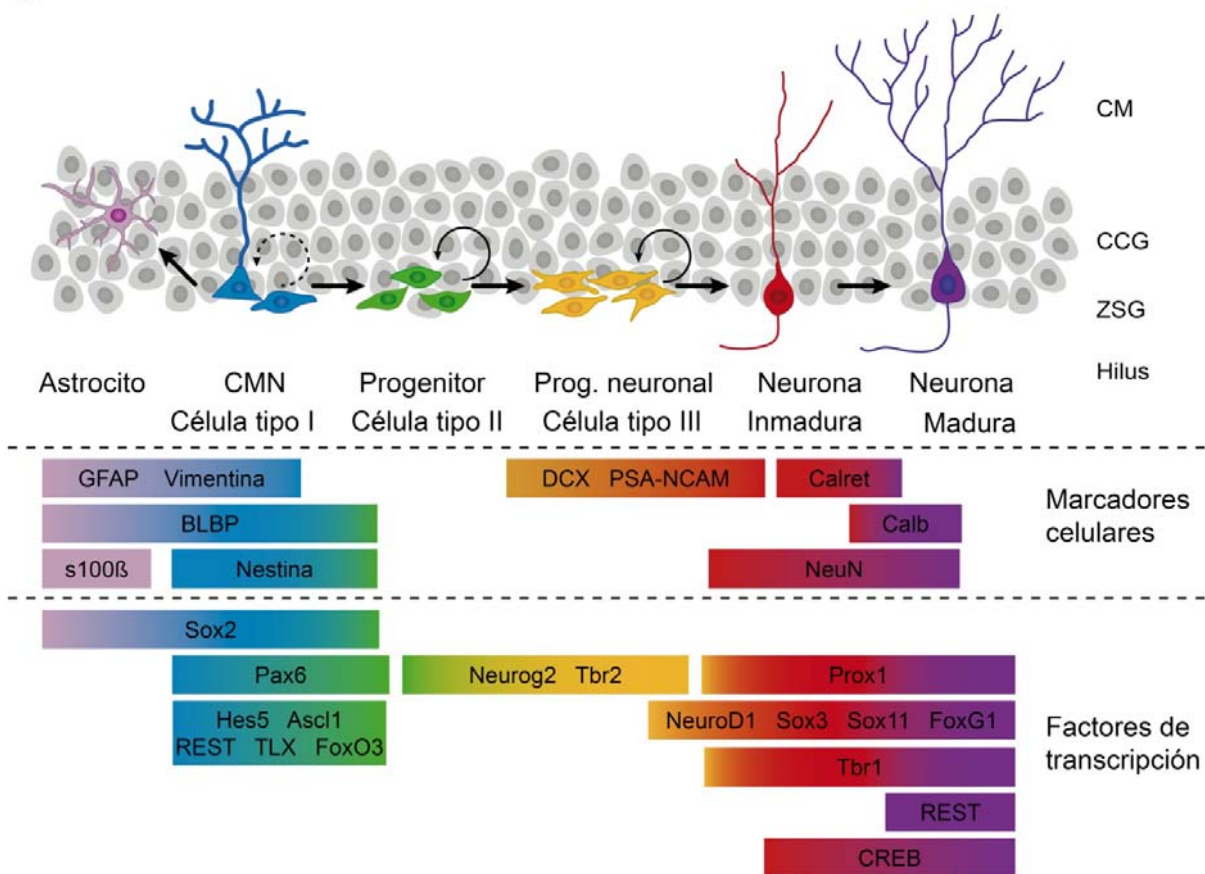


Figura 4: Estructura tridimensional del HP de ratón y humano. Los dibujos muestran la localización y forma del HP en el cerebro de ratón **(A)** y humano **(B)** desde distintas perspectivas. Nótese la compleja disposición tridimensional del HP tanto en ratón como en humano. C = caudal; D=dorsal; R=rostral; V=ventral.



B



Basado en Roybon et al. 2009; Hodge et al. 2012; Hsieh 2012; Encinas et al. 2011; Bonaguidi et al. 2011; Lugert et al. 2012; Song et al. 2012.

Figura 5: Esquemas del desarrollo embrionario y postnatal, y de la neurogénesis adulta del GD del HP. (A)

Los dibujos muestran el desarrollo del GD de la rata desde etapas embrionarias hasta la edad postnatal tardía. En el esquema puede observar la evolución de las distintas matrices de células proliferativas. **(B)** Representación esquemática de los distintos estadios celulares desde la célula madre neural hasta la célula grano madura. Para cada uno de los estadios se indican los marcadores celulares y/o la expresión de factores de transcripción que los caracterizan. CCG=capa de células grano; CCP=capa de células piramidales; CM=capa molecular; GDd=hoja dorsal del giro dentado; GDv=hoja ventral del giro dentado; ZSG=zona subgranular.

De acuerdo con lo dicho, los distintos tipos neuronales que componen el HP se producen a distintos tiempos a lo largo del desarrollo del HP. En la rata, la gran mayoría de las neuronas de los estratos (*stratum oriens*, *stratum radiatum* y *stratum lacunosum moleculare*) se generan entre los días E15 y E17. Las neuronas piramidales del Asta de Ammón se producen entre los días E16 y E17, aunque existen diferencias entre regiones. Las neuronas que ocupan la región hilar y la capa molecular (CM) del GD se originan entre los días E15-19. Por el contrario, las neuronas grano se empiezan a formar a E17, aunque la gran mayoría se originan postnatalmente ($\approx 85\%$) (Altman y Bayer 1990b; Galichet et al. 2008; Iwano et al. 2012). Antes del nacimiento, menos de un 10% de las neuronas piramidales MAP2⁺ son (del inglés *Microtubule-Associated Protein 2*) son GABA⁺, mientras que en el hilus un 50% son GABA⁺ y en la CCG un 25%. Sin embargo, después del nacimiento, las células GABA⁺ son muy abundantes en todas las capas del HP (Soriano et al. 1994).

4.2. Neurogénesis hipocampal adulta

La ZSG del GD adulto contiene células madre y progenitores con capacidad de proliferación que darán lugar a nuevas neuronas grano durante toda la vida del individuo. Las células madre (células tipo I) son células quiescentes o con una tasa de división baja que poseen un único proceso que se extiende radialmente por la CCG y se ramifica en la CM. Además, se han identificado células tipo I con procesos horizontales cortos que se dividen más rápidamente. Ambas células tipo I se caracterizan por la expresión de marcadores como GFAP (del inglés *glial fibrillary acidic protein*), BLBP (del inglés *brain acid binding protein*) y Nestina, entre otros (Fig. 5 B). Estas células tipo I dan lugar a progenitores de amplificación (tipo IIa y IIb), aún no determinados a un fenotipo neuronal, que presentan procesos tangenciales cortos y que se localizan formando grupos en la ZSG. Estos progenitores originan progenitores neuronales (células tipo III), los cuales comenzarán a expresar marcadores como doblecortina (DCX) o PSA-NCAM antes de comenzar a diferenciarse en neuronas. Finalmente, las neuronas grano se caracterizan por la expresión de marcadores como calretinina (menos maduras), calbindina, NeuN (maduras) (del inglés, *Neuronal Nuclei*) (Overstreet-Wadiche y Westbrook 2006; Fuentealba et al. 2012; Hodge et al. 2012; Hsieh 2012) y alcanzarán una maduración morfológica y funcional (van Praag et al. 2002). Es importante destacar que sólo una pequeña parte de las células generadas se integran en el circuito como neuronas maduras, ya que la mayoría de las células sufren apoptosis en los primeros días, durante la transición entre progenitores y neuroblastos. Estas células apoptóticas serán eliminadas rápidamente por la microglía mediante fagocitosis (Sierra et al. 2010) (Fig. 5 B).

Los distintos estadios celulares desde las células tipo I hasta las neuronas grano están regulados por la expresión de una serie de factores de transcripción. En las células tipo I, se expresan Sox2 (del inglés *SRY, sex determining region Y, -box 2*), Hes5 (del inglés *hairy and enhancer of split 5*) y Pax6 (del inglés *paired box 6*), entre otros, cuya expresión se mantiene en las células tipo II. La transición entre células tipo IIb o células tipo III al linaje neuronal está mediada por la acción de factores como Neurog2 (Neurogenina 2) y Tbr2. Por ello, la expresión de estos dos factores es necesaria para la especificación al fenotipo neuronal de los progenitores del GD y su inhibición produce una disminución de los progenitores y una pérdida de neuronas (Galichet et al. 2008; Hodge et al. 2008; Roybon et al. 2009). Además, Tbr2 es necesario para la correcta migración y maduración

de los progenitores neuronales (Hodge et al. 2013). NeuroD1 (del inglés *neuronal differentiation 1*) es activado a través de la vía de Wnt y promueve el inicio de la maduración de las neuronas grano del GD (Kuwabara et al. 2009). Más tardíamente, también se expresan Prox1 (del inglés *prospero homeobox 1*), CREB (del inglés *DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with CreC*) o Tbr1 (Roybon et al. 2009; Hodge et al. 2012; Hsieh 2012; Song et al. 2012) (Fig. 5 B). Prox1 es crítico para la supervivencia y la adquisición de la identidad de células grano del GD, de manera que cuando se bloquea su expresión, las células inmaduras originan neuronas piramidales (Lavado et al. 2010; Karalay et al. 2011; Iwano et al. 2012). Tbr1 es necesario para la formación de las neuronas glutamatérgicas de la corteza cerebral. En el GD tiene un patrón de expresión similar al de Prox1, pero no se conoce totalmente su papel durante la neurogénesis hipocampal (Hodge et al. 2008; Hodge et al. 2012).

El desarrollo de nuevas tecnologías ha permitido hacer grandes avances en el estudio de las propiedades de las CMN *in vivo* (Zhao et al. 2006; Manganas et al. 2007). Una célula tipo I, una vez activada, posee capacidad de autorrenovación para mantener la población de células madre a través de divisiones simétricas o puede dividirse asimétricamente para dar lugar a una célula tipo I o a un progenitor neural tipo II o a dos progenitores tipo II. Además, puede diferenciarse en un astrocito directamente (Bonaguidi et al. 2011). Adicionalmente, otros autores han propuesto que los progenitores de amplificación tipo IIa sólo se dividen una vez mientras que los tipo IIb poseen una mayor tasa de división (Lugert et al. 2012). En cambio, en otros estudios se ha observado que la población de células madre en el GD se va agotando a lo largo de la edad del individuo. De manera que cuando una célula madre es activada, inicialmente genera neuronas y después de una serie de divisiones asimétricas rápidas, se diferencia a un astrocito maduro. Aunque cabe la posibilidad de que la autorrenovación de las células madre en el GD sea baja en condiciones fisiológicas, pero podría incrementarse ante determinadas situaciones (Encinas et al. 2011) (Fig. 5 B). Uno de los factores clave para mantener las células madre neurales en quiescencia es BMP (del inglés *bone morphogenetic protein*). De hecho, el bloqueo de BMP, inicialmente promueve la entrada en ciclo de las células madre del GD, aumentando la neurogénesis pero progresivamente se agotará la formación de progenitores y nuevas neuronas (Mira et al. 2010).

4.3. Estructura y fisiología del HP

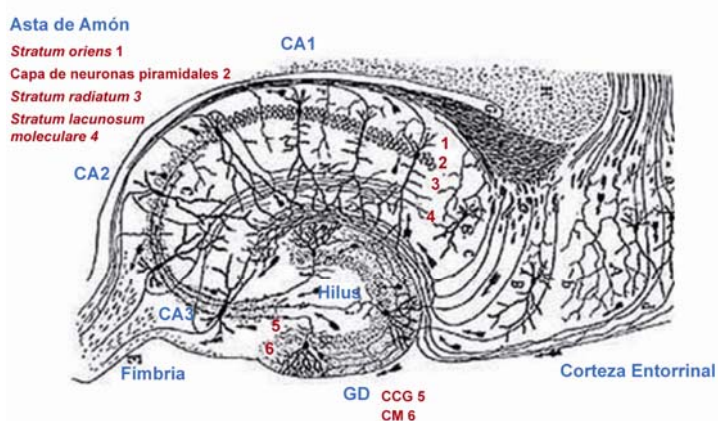
En las dos principales regiones del HP, el GD y el Asta de Ammón, se distingue una capa de neuronas altamente compactada, rodeada de otra capa con menor densidad celular (Fig. 6 A). Así, se pueden distinguir las siguientes zonas y capas:

- En el giro dentado:
 - capa de neuronas grano (CCG): se dispone en dos hojas (dorsal y ventral) entre las cuales se distingue el hilus o región hilar (Hi);
 - capa molecular (CM): rodeando externamente la CCG;

- En el Asta de Ammón:
 - una zona molecular interna dividida a su vez en *stratum lacunosum moleculare* y *stratum radiatum*;
 - la capa de neuronas piramidales;
 - zona molecular externa (*stratum oriens*).

La información que llega al HP pasa por las principales neuronas hipocampales a través de un circuito trisináptico (ver leyenda Fig. 6) (Song et al. 2012). Todas las sinapsis entre las neuronas grano y las piramidales son de tipo glutamatérgico. Además, las neuronas grano reciben sinapsis GABAérgicas de interneuronas del GD (Zhao et al. 2008). Las nuevas neuronas incorporadas al circuito preexistente muestran una mayor excitabilidad y plasticidad que las neuronas antiguas, y están involucradas en el aprendizaje y la memoria espacial a largo plazo, la discriminación espacial y la reorganización de la memoria (Aimone et al. 2011; Ming y Song 2011).

A



B

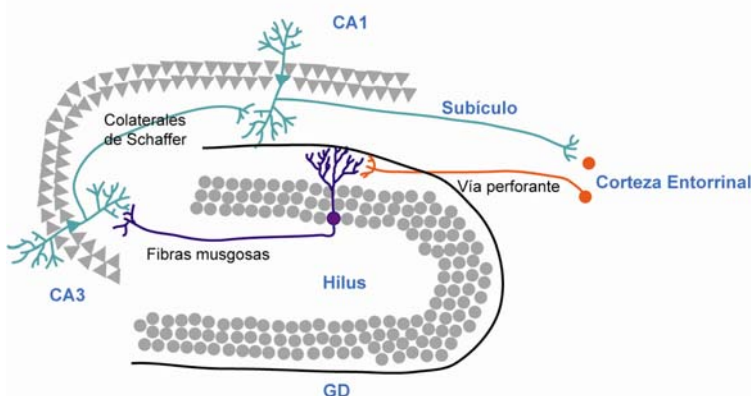


Fig. 6: Estructura y circuito sináptico del hipocampo de roedores. (A) Dibujo realizado por Santiago Ramón y Cajal en el que se muestra la estructura del HP del ratón, donde se distinguen las distintas capas que lo componen y los circuitos sinápticos hipocampales. **(B)** Esquema simplificado del circuito trisináptico que forman las neuronas en el HP. La información llega desde la corteza entorrinal por la vía perforante hasta las dendritas de las neuronas grano. Los axones de las neuronas grano forman las fibras musgosas que hacen sinapsis con las dendritas de las neuronas piramidales de CA3, cuyos axones constituyen las proyecciones de las colaterales de Schaffer. Estos axones hacen sinapsis con las dendritas de las neuronas piramidales de CA1 y sus axones salen por el subículo, transmitiendo la información hacia la corteza entorrinal. CA=cornus o asta de Amón; CCG=capa de células grano; CM=capa molecular; GD=giro dentado; ZSG=zona subgranular.

5. Factores que regulan la neurogénesis

La neurogénesis está regulada a todos los niveles celulares, desde la activación de las CMNs, la proliferación, supervivencia y la diferenciación de los progenitores hasta la supervivencia, migración, maduración e integración de las nuevas neuronas. Es crítico para mantener la

neurogénesis el microambiente en el que se encuentran las CMN, denominado nicho neurogénico. Este nicho incluye las células que rodean a las células madre (las neuronas grano y otros tipos neuronales, junto con astrocitos y oligodendrocitos en el GD, y las células endodiales, entre otras, en la ZSV) y los factores secretados por las células (Rando 2006; Ming y Song 2011). Además, la ZSV y el GD están asociados a la vasculatura, por lo que determinados factores también pueden llegar a través de los vasos sanguíneos. Entre los factores se incluyen neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento (Zhao et al. 2008; Hurtado-Chong et al. 2009; Suh et al. 2009; Ehm et al. 2010; Mira et al. 2010; Faigle y Song 2012; Fuentealba et al. 2012).

Además de por factores extracelulares, la neurogénesis está regulada por mecanismos celulares intrínsecos, incluyendo la expresión de factores de transcripción, reguladores del ciclo celular y mecanismos epigenéticos (Zhao et al. 2008; Román-Trufero et al. 2009; Hirabayashi y Gotoh 2010; Mu et al. 2010; Mendez-Gomez et al. 2011; Iwano et al. 2012; Mendez-Gomez y Vicario-Abejon 2012).

Asimismo, la neurogénesis está regulada por estímulos fisiológicos como ambientes enriquecidos, ejercicio físico, edad, comportamiento social... (Kempermann et al. 1997; van Praag et al. 1999; Bednarczyk et al. 2011; Dranovsky et al. 2011). Por otro lado, determinadas situaciones patológicas también pueden afectar la neurogénesis como isquemia, inflamación, stress o enfermedades neurodegenerativas (Coras et al. 2010; Ming y Song 2011).

En estas tesis nos vamos a centrar en el papel de varios factores extracelulares en la regulación de algunos pasos de la neurogénesis del BO y del GD, todos ellos con la característica común de unirse a receptores tipo tirosina quinasa.

5.1. Factores de crecimiento

5.1.1. FGF-2

El factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2, del inglés *fibroblast growth factor 2*) es una cadena de aminoácidos de 18,8 KDa y pertenece a la familia de los FGFs. Esta familia de factores constituyen un sistema muy conservado a lo largo de la evolución de los metazoos (Itoh y Ornitz 2011). En vertebrados, esta familia está constituida por 22 miembros que se dividen en 7 subfamilias según su homología y función (Tabla 1). La mayoría de ellos (canónicos) son secretados al espacio extracelular y actúan de forma autocrina o paracrina. Los de otro grupo funcionan de manera endocrina, de forma

Tabla 1: Miembros de la familia de los FGFs			
Ligandos		Receptores	
Subfamilia	Miembro	FGFR	
Canónicos	FGF1	FGF-1	1, 2, 3, 4
		FGF-2	1, 2, 3, 4
	FGF4	FGF-5	1, 2
		FGF-4	1, 2, 3, 4
		FGF-6	1, 2, 4
	FGF8	FGF-8	1, 2, 3, 4
		FGF-17	1, 2, 3, 4
		FGF-18	2, 3, 4
	FGF9	FGF-9	2, 3
		FGF-16	2, 3
		FGF-20	1, 2, 3, 4
	FGF10	FGF-7	2, 4
		FGF-3	1, 2
Similares a hormonas	FGF15/19	FGF-15/19	1, 2, 3, 4
		FGF-21	1, 2, 3, 4
		FGF-23	1, 2, 3, 4
Intracelulares	FGF11	FGF-11	
		FGF-12	
		FGF-13	
		FGF-14	

similar a las hormonas. En un tercer grupo ejercen su función intracelularmente por lo que no son secretados. FGF-2 tiene un peso molecular de 18,8 KDa y, junto con FGF-1, pertenece a la subfamilia FGF1 (Itoh y Ornitz 2004; Mason 2007; Dorey y Amaya 2010; Guillemot y Zimmer 2011; Itoh y Ornitz 2011).

Los FGFs, exceptuando los intracelulares, son secretados al espacio extracelular, donde se unen a proteoglicanos heparan sulfato y activan de forma autocrina o paracrina receptores tirosina quinasa. En vertebrados, existen cuatro receptores (FGFR1-4) constituidos por una proteína transmembrana simple de unos 800 aminoácidos, con un dominio extracelular que se une al ligando y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa y que interacciona con los sustratos y las moléculas de señalización intracelular (Fig.7) (Guillemot y Zimmer 2011; Itoh y Ornitz 2011). La región extracelular contiene dos o tres dominios similares a inmunoglobulinas y un dominio de unión a heparina. Además, existen múltiples isoformas generadas por ajuste o *splicing* alternativo (Itoh y Ornitz 2004).

Expresión de Fgf-2 y sus receptores

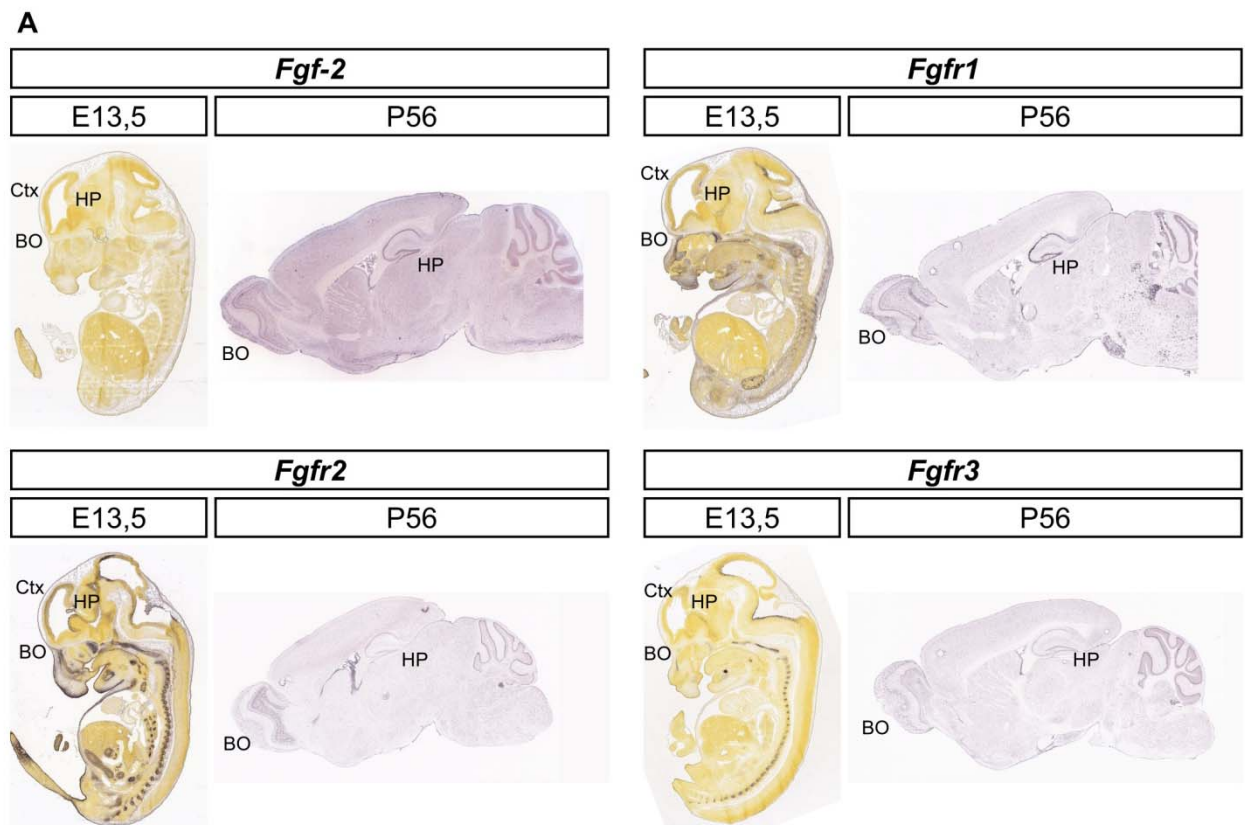
Fgf-2 se expresa abundantemente en el neuroepitelio del telencéfalo durante el periodo embrionario (Vaccarino et al. 1999; Raballo et al. 2000; Maric et al. 2007). En el individuo adulto, se ha detectado expresión en la ZSV, el GD, el BO, la corteza y la sustancia *nigra*, entre otras regiones (Fig. 7 A) (Ernfors et al. 1990a; Mudo et al. 2007; Mudò et al. 2009; Zechel et al. 2010).

Los principales receptores de FGF-2 en el cerebro son FGFR1, 2 y 3. Estos tres receptores se expresan durante el desarrollo embrionario (Vaccarino et al. 1999; Raballo et al. 2000; Maric et al. 2007). En la ZSV adulta, se ha encontrado expresión de *Fgfr1* y *Fgfr2* en las células proliferativas, mientras que *Fgfr3* aparece en células no proliferativas. Por otro lado, en el GD del HP, *Fgfr1* se expresa en las células proliferativas de la ZSG, en contra, *Fgfr2* y *Fgfr3* se localiza en las células no proliferativas (Fig. 7 A) (Mudo et al. 2007; Mudò et al. 2009). Además, *Fgfr1* se expresa abundantemente en neuronas del cerebro adulto, mientras que *Fgfr2* y *Fgfr3* se encuentra en células gliales (Young et al. 2010; Zechel et al. 2010).

Vías de señalización de FGF-2

La unión de los FGFs al receptor produce la dimerización y autofosforilación del receptor, activándose una serie de vías de señalización entre las que se incluyen la vía MAP quinasa (del inglés *mitogen-activated protein kinase*) y la de la fosfatidilinositol quinasa (PI3K, del inglés *phosphatidylinositol 3 kinase*) (Fig. 7 B) (Dorey y Amaya 2010; Guillemot y Zimmer 2011).

La vía de la MAP quinasa es una de las vías más utilizadas por los FGFs. La autofosforilación del receptor activa a FRS2 (del inglés *fibroblast growth factor receptor substrate 2*) que se unirá a Grb2 (del inglés *growth factor receptor-bound protein 2*), la cual produce la activación de una serie de quinasas que actuarán sobre varios factores de transcripción y la inducción de múltiples inhibidores retrógrados como Sef, MKP3 (del inglés *Mitogen-activated protein kinase phosphatase 3*) y Sproutys. Esta vía está implicada en el efecto de FGFs en la proliferación celular y diferenciación (Fig. 7 B).



Allen Brain Atlas

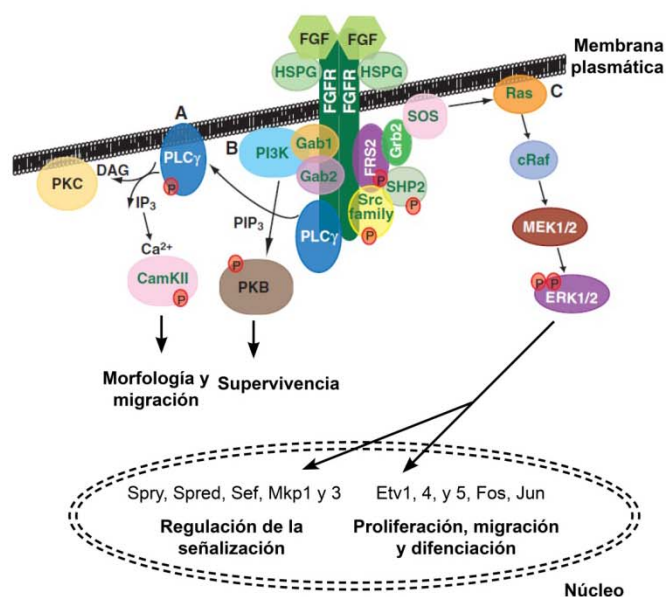
B

Figura 7: Expresión de FGF-2 y sus receptores y esquema de las vías de señalización. (A) Las imágenes corresponden a hibridaciones *in situ* que muestran la expresión de *Fgf-2* y sus receptores más abundantes en el SNC durante el desarrollo embrionario y en el individuo adulto. (B) Esquema de las principales vías de señalización que se activan por la unión de FGF-2 a su receptor y las acciones celulares que desencadena cada una de ellas. De entre las acciones de FGF-2, en esta tesis nos hemos centrado en estudiar su papel en la proliferación y mantenimiento del estado indiferenciado de CMBO. BO=Bulbo olfatorio; Ctx=corteza cerebral; HP=hipocampo.

Modificado de Dorey y Amaya, 2010; y Guillemot y Zimmer, 2011

Funciones de FGF-2

Durante los primeros estadios del desarrollo embrionario, los FGFs son necesarios para la inducción del neuroectodermo y, más adelante, para en la generación de distintos tipos de neuronas en determinadas regiones del cerebro (Guillemot y Zimmer 2011; Yoo et al. 2011). Además, los FGFs tienen un papel importante en la supervivencia y expansión de los progenitores neurales y estimulan

la migración celular durante el desarrollo embrionario, así como el crecimiento axonal (Vicario-Abejón et al. 1995; Vaccarino et al. 1999; Maric et al. 2007; Mason 2007; Vergaño-Vera et al. 2009; Guillemot y Zimmer 2011).

Por otro lado, los FGFs se han asociado a múltiples desórdenes neurológicos y a enfermedades neurodegenerativas (Mason 2007; Guillemot y Zimmer 2011). De hecho, se ha observado una menor expresión de los *Fgfs* y sus receptores en la corteza prefrontal y el hipocampo de pacientes con depresión, lo que podría contribuir a la atrofia de esas áreas (Evans et al. 2004).

Uno de los objetivos de esta tesis ha sido analizar el papel de FGF-2 en la proliferación y mantenimiento del estado indiferenciado de las CMBO, por ello, a continuación, vamos a hacer una revisión más detallada sobre el conocimiento existente sobre la función FGF-2 en la proliferación y la supervivencia celular.

Proliferación y supervivencia celular

El FGF-2 promueve la autorrenovación y la proliferación de los progenitores del neuroepitelio durante el desarrollo embrionario (Vicario-Abejón et al. 1995; Vaccarino et al. 1999; Raballo et al. 2000; Vicario-Abejón et al. 2003; Maric et al. 2007). Este efecto también se ha observado en células embrionarias pluripotentes, siendo FGF-2 necesario para su proliferación, autorrenovación y para mantener su estado indiferenciado (Eiselleova et al. 2009; Greber et al. 2011).

En estudios *in vitro*, se ha demostrado que la adición de FGF-2 en cultivos de progenitores corticales embrionarios produce un acortamiento de la fase G₁ del ciclo celular, aumentando la tasa de proliferación (Lukaszewicz et al. 2002). Además, en otros trabajos se ha visto que en estadios tempranos, FGF-2 produce un incremento del número de neuronas de la zona dorsal del neuroepitelio (corteza), mientras que en estadios más tardíos favorece la formación de astrocitos (Vaccarino et al. 1999; Qian et al. 2000). Este hecho se pone de manifiesto en embriones carentes o *knock-out* (KO) para *Fgf-2*, los cuales presentan una reducción de las células BrdU⁺ y de progenitores en el neuroepitelio, así como un menor número de neuronas en la corteza cerebral. Sin embargo, el número de neuronas de la zona ventral (eminencias ganglionares) no se ve afectado por la acción de FGF-2 (Raballo et al. 2000).

En cultivos de células obtenidas a partir de HPs embrionarios, FGF-2 promueve la proliferación de las células nestina⁺ (Ray et al. 1993; Vicario-Abejón et al. 1995). Además, FGF-2 favorece la supervivencia de neuronas calbindina⁺ en cultivos de células hipocámpales (Vicario-Abejón et al. 1995). Sin embargo, todos los progenitores neurales no son capaces de responder a FGF-2, como se ha demostrado en cultivos de progenitores embrionarios de retina donde FGF-2 es insuficiente para mantener la proliferación y autorrenovación celular (Otaegi et al. 2007).

A diferencia de lo observado *in vitro*, en estudios *in vivo* el efecto de FGF-2 en la proliferación celular es variable. Por un lado, se ha observado que cuando FGF-2 es administrado subcutáneamente en animales postnatales, se produce un incremento de la proliferación de progenitores en el GD, mientras que en individuos adultos no se observa dicho efecto (Wagner et al. 1999; Cheng et al. 2002). Similares resultados se obtuvieron en ratas adultas, las cuales no mostraron cambios en la proliferación en el GD cuando FGF-2 fue administrado intraventricularmente (Kuhn et

al. 1997). Sin embargo, en trabajos posteriores en los que FGF-2 también fue administrado intraventricularmente, se observa un aumento de la proliferación tanto en animales jóvenes como adultos (Jin et al. 2003). Estos resultados contradictorios podrían ser debidos a variaciones en los niveles de FGF-2 en el GD entre los diferentes estudios. Además, se ha descrito que FGF-2 podría interactuar con cofactores como la cistatina C que favorecen su actividad (Taupin et al. 2000).

En la ZSV adulta se ha visto que altos niveles de FGF-2 favorece la proliferación de los progenitores neurales (Kuhn et al. 1997; Wagner et al. 1999; Jin et al. 2003; Zheng et al. 2004; Mudo et al. 2007). Este efecto en la proliferación celular es neutralizado cuando se inyectan anticuerpos anti-FGF-2 en el ventrículo (Mudo et al. 2007).

5.1.2. EGF

El factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés *epidermal growth factor*) pertenece a la familia de los EGFs que incluye, también, el factor de crecimiento de transformación (TGF α , del inglés *transforming growth factor α*) y la anfiregulina (AR, del inglés *amphiregulin*), entre otros. EGF se unen al receptor de EGF (EGFR) al que también se puede unir TGF α y AR (Yamada et al. 1997; Wong y Guillaud 2004).

El EGF es una cadena polipeptídica de 53 aminoácidos, con 6 cisteínas que forman puentes disulfuros, importantes para mantener la actividad biológica de la proteína. EGF se sintetiza como un precursor de 1.217 aminoácidos, que sufrirá proteólisis para generar la proteína madura. Este precursor de EGF es una proteína transmembrana glicosilada de unos 140-150 kDa que, en algunas circunstancias, compete con el EGF maduro para unirse al receptor (Yamada et al. 1997; Wong y Guillaud 2004).

El EGFR es una proteína transmembrana de 170 kDa compuesta por una cadena polipeptídica de 130 kDa unida a una cadena de oligosacáridos. En la parte intracelular, el EGFR posee un dominio tirosina quinasa que se activa tras la unión al ligando (Yamada et al. 1997; Jorissen et al. 2003; Wong y Guillaud 2004).

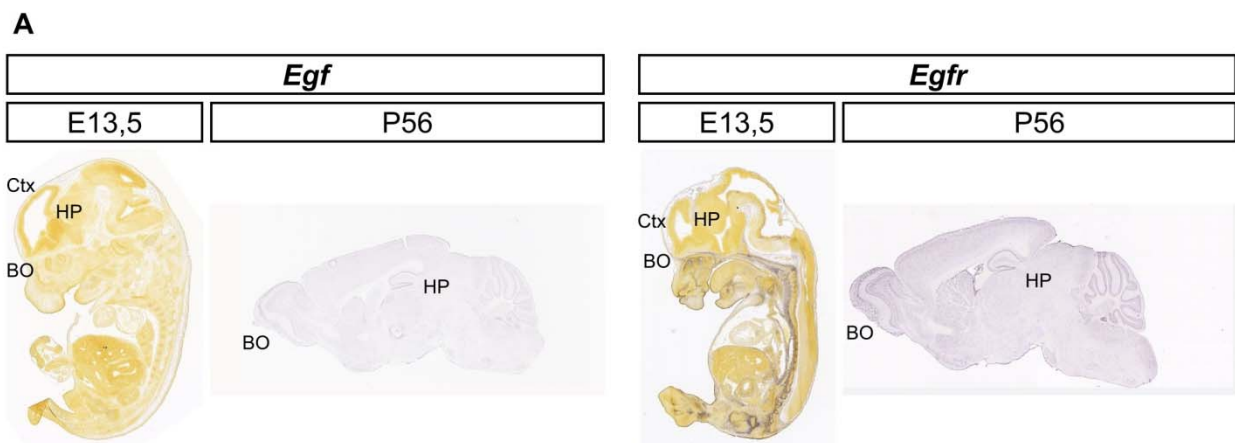
Expresión de EGF y su receptor

El *Egf* es sintetizado desde etapas tempranas del desarrollo hasta la edad adulta en una gran variedad de tejidos como el cerebro, el riñón o el páncreas, aunque su expresión va disminuyendo. En el cerebro se ha encontrado en todas las regiones estudiadas, entre las que se incluyen el cerebelo, la corteza, el HP o el BO, así como en el líquido cerebroespinal. Los niveles más altos del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) de *Egf* se localizan en el BO, hipotálamo, estriado y cerebelo (Yamada et al. 1997; Wong y Guillaud 2004) (Fig. 8 A).

El EGFR es detectado desde el desarrollo embrionario y continúa en el individuo adulto. Numerosos tipos celulares expresan *Egfr* en el cerebro como las neuronas de Purkinje del cerebelo, neuronas corticales, neuronas piramidales del HP, células del estriado y de la ZSV, astrocitos y oligodendrocitos (Yamada et al. 1997; Doetsch et al. 2002) (Fig. 8 A).

Vías de señalización de EGF

Cuando EGF se une a EGFR, este se dimeriza y se activa por autofosforilación, lo que provoca la activación de una serie de vías de señalización entre las que se incluyen la vía de MAP quinasa y la vía de la PLCγ (Yamada et al. 1997; Jorissen et al. 2003; Wong y Guillaud 2004). Además, EGF también puede activar otras vías como la PI3K, STAT o Jak (Fig. 8 B). La activación de la vía de la MAP quinasa por EGF se produce de forma similar a la descrita para FGF-2 (ver apartado 5.1.1 de la introducción), promoviendo la proliferación celular.



Allen Brain Atlas

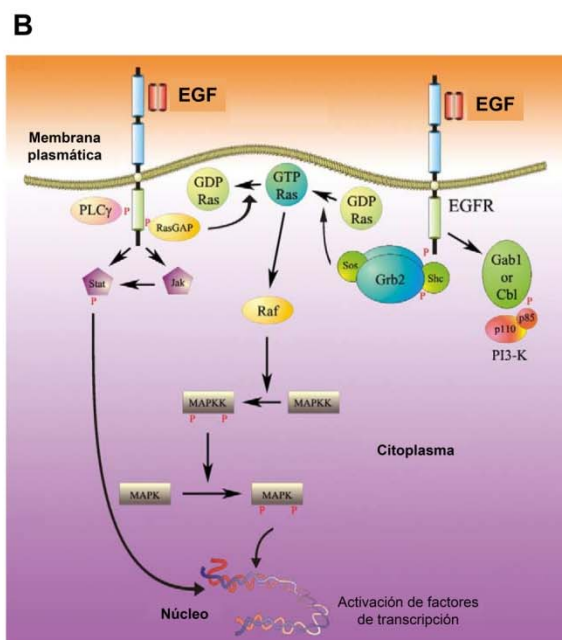


Figura 8: Expresión de *Egf* y *Egfr* y esquema de sus vías de señalización intracelular. (A) Las imágenes muestran hibridaciones *in situ* para detectar el ARNm de *Egf* y su receptor en secciones de tejido de ratón durante el desarrollo embrionario y adulto. (B) Esquema simplificado de las vías de señalización de EGF. En esta tesis nos hemos centrado en estudiar el papel de EGF en la proliferación y mantenimiento del estado indiferenciado de CMBO. BO=Bulbo olfatorio; Ctx=corteza cerebral; HP=hipocampo.

Basado en Wong y Guillaud 2004

Funciones de EGF

El EGF es necesario para el correcto desarrollo embrionario. De hecho ratones KO para *Egfr* sufren afecciones severas, aunque con variaciones según la cepa. En los casos más graves, la falta de EGFR causa muerte preimplantación o durante la gestación. Sin embargo, algunos ratones sobreviven postnatalmente hasta tres semanas a pesar de presentar problemas en la piel, pulmón, tracto

gastrointestinal, cerebro e hígado. Además, suelen desarrollar enfermedades neurodegenerativas y mueren en el primer mes de vida (Jorissen et al. 2003; Wong y Guillaud 2004).

De todas las funciones en las que está implicado EGF, en esta tesis hemos realizado especial atención en la influencia de EGF en la proliferación y supervivencia celular.

Proliferación y supervivencia celular

Un indicativo de la importancia de EGF en la proliferación celular, se observa cuando se cultivan células de tejido embrionario como el estriado, el hipocampo o del BO en presencia de EGF, siendo estas células capaces de proliferar formando neurosféricas y diferenciarse posteriormente *in vitro* (Reynolds y Weiss 1996; Shetty 2004; Vergaño-Vera et al. 2009; Egawa et al. 2011). Adicionalmente, EGF favorece la supervivencia de los progenitores neurales como se ha demostrado en cultivos de células obtenidas a partir de tejido cortical de fetos humanos (Nelson et al. 2008).

EGF también promueve la proliferación celular en el individuo adulto. Cuando EGF es administrado en el estriado de ratas adultas, se observa un aumento de la proliferación de los progenitores neuronales y gliales en zonas adyacentes a la inyección (McGinn et al. 2004). En la ZSV adulta también se ha observado un aumento de la proliferación celular en respuesta a EGF (Craig et al. 1996; Kuhn et al. 1997; Doetsch et al. 2002; Iguchi et al. 2011), actuando principalmente sobre las células C aunque también puede actuar sobre las células B (Doetsch et al. 2002; Gonzalez-Perez y Quinones-Hinojosa 2010). Además, se ha visto que para el mantenimiento de la señalización de EGF en la ZSV es importante Dyrk1 (del inglés *dual-specificity tyrosine regulated protein kinase 1*), la cual inhibe la degradación del EGFR favoreciendo la proliferación celular (Ferron et al. 2010). Por otro lado, EGF induce la proliferación de células Olig2⁺/Sox2⁺ en la RMS (Lindberg et al. 2012) y la expansión de los progenitores de la ZSV adulta, así como su migración y diferenciación en oligodendrocitos en zonas como el estriado, septum, cuerpo calloso o fimbria (Aguirre y Gallo 2007; Gonzalez-Perez et al. 2009).

Además, EGF, en combinación con FGF-2, es utilizado para la expansión de CMN obtenidas a partir de diversos tejidos como el BO, la ZSV o el estriado, tanto de origen embrionario como adulto, creciendo como neurosféricas o adheridas al sustrato (Gritti et al. 1996; Gritti et al. 1999; Vicario-Abejón et al. 2003; Vergaño-Vera et al. 2009). Es más, recientemente se ha demostrado que el aporte controlado y continuo de FGF-2 es necesario para el mantenimiento de las CMN obtenidas de la ZSV de ratones adultos, aumentando su tasa de proliferación y disminuyendo la muerte celular y la senescencia (Galderisi et al. 2013). Sin embargo, no existe una estandarización de los protocolos utilizados para la expansión de las CMN, en cuanto a la concentración o frecuencia de adición de FGF-2 y EGF, ni se conocen completamente los mecanismos por los cuales dichos factores favorecen la proliferación celular y el estado indiferenciado de las CMNs, cuestiones que hemos abordado en esta tesis (Vicario-Abejón et al. 2003; Coles-Takabe et al. 2008; Vergaño-Vera et al. 2009; Pastrana et al. 2011).

5.1.3. IGF-I

El factor de crecimiento similar a la insulina I, IGF-I (del inglés *insulin-like growth factor I*) forma parte de la familia de la insulina. Esta familia está formada por dos grupos de péptidos: uno

incluye la insulina y los IGFs y otro la relaxina y las hormonas similares a la insulina. En el grupo de la insulina, cada péptido se une a un receptor específico, aunque existe una cierta promiscuidad entre ellos (Tabla 2). Además, el receptor de la insulina y el IGF-IR pueden formar heterodímeros que unirían con la misma afinidad IGF-I e insulina (Valenciano et al. 2006). Asimismo, existen 6 proteínas de unión a IGFs (IGFBP, de las siglas en inglés *IGF binding proteins*) que aumentan su vida media impidiendo la proteólisis y modulan la interacción con el receptor. IGF-I puede unirse a las IGFBP1-5 con una afinidad alta y a la IGFBP6 con baja, mientras que IGF-II se une a la IGFBP6 con alta afinidad y con baja al resto (Bondy y Cheng 2004; Fernandez y Torres-Aleman 2012).

Tabla 2: Miembros de la familia de la insulina		
Ligando	Receptor	Proteínas de unión
Insulina	Receptor de insulina (afinidad alta) y IGF-IR (afinidad baja)	No
IGF-I	IGF-IR (afinidad alta), receptor de insulina (afinidad baja) y IGF-IIR (afinidad muy baja)	IGFBP1–5 (afinidad alta) y IGFBP6
IGF-II	IGF-IIR (afinidad alta), IGF-IR (afinidad baja) y receptor de insulina (afinidad muy baja)	IGFBP6 (afinidad alta) y IGFB1–5

El IGF-I maduro es una cadena polipeptídica simple de 7,5 kDa compuesta por 70 aminoácidos, que se divide en varios dominios (Fig.11 de Material y Métodos). Para la unión al receptor son críticos los residuos de tirosina presentes en posición 24, 31 y 60. La estructura terciaria de la proteína está estabilizada por tres puentes disulfuro intracatenarios. El gen que codifica para el IGF-I está altamente conservado a lo largo de la evolución, ya que 57 de los 70 aminoácidos son idénticos en mamíferos, aves y anfibios (Liu et al. 1993; Russo et al. 2005; Annunziata et al. 2011).

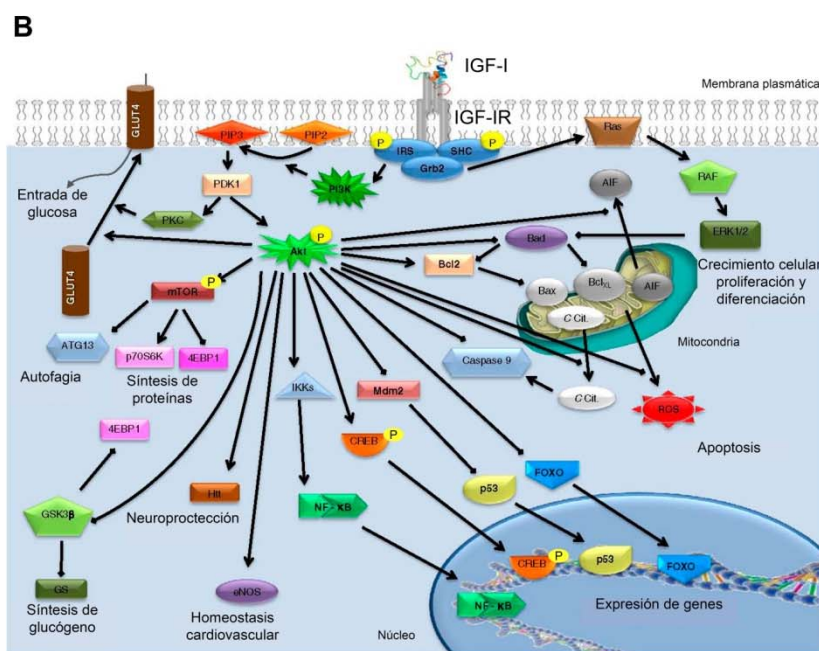
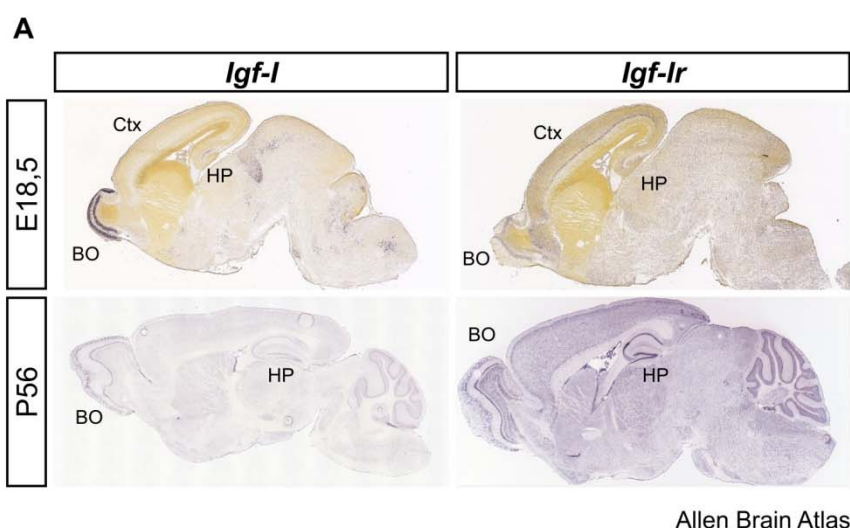
El IGF-IR pertenece a una familia de receptores tirosina quinasa que se caracterizan por formar tetrámeros compuestos por dos subunidades α y dos β , unidas covalentemente por puentes disulfuro. El gen *IGF-IR* codifica una cadena simple de 1.367 aminoácidos de 180 kDa que es procesada para generar las subunidad α y β . Posteriormente, estas subunidades serán glicosiladas y proteolizadas para formar las subunidades maduras. La parte extracelular de la subunidad α contiene la zona de unión a IGF-I, mientras que la subunidad β atraviesa la membrana plasmática y posee el sitios de fosforilación de tirosinas (Russo et al. 2005; Annunziata et al. 2011).

Expresión de IGF-I y su receptor

El IGF-I se produce abundantemente durante el desarrollo embrionario en la mayoría de los tejidos, pero su expresión se va reduciendo durante el desarrollo postnatal. En el individuo adulto, IGF-I se sintetiza abundantemente en el hígado estimulado por la acción de la hormona del crecimiento (GH, del inglés *Growth Hormone*). Además, existe una ligera producción local en numerosos tejidos entre en los que se encuentra el SNC, en regiones como la ZSV, el BO, el HP o el cerebelo (Fig. 9 A)(Rotwein et al. 1988; Ye et al. 1997). En el cerebro, la síntesis se produce principalmente en neuronas y no está regulada por la GH (Bartlett et al. 1991; Bartlett et al. 1992; Bondy y Cheng 2004; Russo et al. 2005; Fernandez y Torres-Aleman 2012). El IGF-I sistémico puede pasar de la sangre al líquido cefalorraquídeo, acoplado a la proteína transportadora de baja densidad LRP2 (del inglés *lipoprotein receptor-related protein 2*), de manera dependiente de los niveles de IGF-I en sangre. Además, IGF-I puede atravesar la barrera hematoencefálica, uniéndose al IGF-IR presente en las células endoteliales. Una vez en el interior, IGF-I se une a la LPR1 y es transportado al lado

La expresión del *Igf-Ir* comienza en etapas tempranas del desarrollo embrionario en regiones como la corteza, el BO, el HP, el cerebelo, el hipotálamo y la médula espinal (Bondy et al. 1990). Postnatalmente, se produce una reducción de los niveles de *Igf-Ir*. En el individuo adulto, se detecta su expresión en los plexos coroideos, las meninges, el BO y el HP (Fig. 9 A) (Bondy y Cheng 2004; Russo et al. 2005; Fernandez y Torres-Aleman 2012).

Además, tanto IGF-I como su receptor se expresan abundantemente en cultivos de célula madre de BO embrionario (CMBOe) (Vicario-Abejón et al. 2003) y también se ha encontrado expresión del *IGF-IR* en cultivos de células madre de HP (CMHP) adulto (Aberg et al. 2003).



Vías de señalización de IGF-I

Cuando IGF-I se une al IGF-IR, se induce la autofosforilación del receptor, asociado a las proteínas adaptadoras IRS (de las siglas en inglés *insulin receptor substrate*). Estas IRS se autofosfoliran y activarán las cascadas de señalización intracelular entre las que se incluyen la vía de la PI3K y la de la MAP quinasa (Fig. 9 B).

La fosfatidilinositol quinasa, a través de PDK, fosforilará la quinasa Akt. Akt dirigirá la translocación de los transportadores de glucosa (GLUTs) a la membrana plasmática. Akt también puede actuar sobre la GSK3 β (del inglés *glycogen synthase kinase 3 β*) que actúa sobre la proteína Tau controlando su hiperfosforilación que conduciría a apoptosis. De manera que la inactivación de la GSK3 β por Akt podría prevenir la muerte celular asociada a acumulación de proteínas Tau como ocurre en enfermedades neurodegenerativas (Bondy y Cheng 2004; Fernandez y Torres-Aleman 2012).

Otro sustrato para Akt es mTOR (del inglés *mammalian target of rapamycin*) que forma parte de dos complejos multiprotéicos (mTOR1 y mTOR2). mTOR1 activa p70S6K regulando la síntesis de proteínas; y mTOR2 activa una serie de quinasa (entre las que se incluye Akt), afectando la proliferación, la migración y el posicionamiento celular (Iwanami et al. 2009; Fernandez y Torres-Aleman 2012; Paliouras et al. 2012; Pun et al. 2012). Akt también actúa sobre FOXO (*forkhead transcription factor*), el cual regula la transcripción de varios genes involucrados en la proliferación celular, estrés oxidativo y la apoptosis (Bateman y McNeill 2006; Fernandez y Torres-Aleman 2012; O'Kusky y Ye 2012). Asimismo, Akt puede activar a CREB que iría al núcleo, regulando la transcripción de genes que intervienen en ciclo celular y supervivencia. Por otro lado, la actividad de Akt puede ser modulada por proteínas como la fosfatasa PTEN (del inglés *phosphatase and tensin homolog*), que inhibe la actividad de la enzima PI3K (Bondy y Cheng 2004; Otaegi et al. 2006) y, de este modo, regulan la diferenciación celular.

La vía de la MAPK se activa de manera similar a lo descrito para FGF-2 (ver apartado 5.1.1) (Bateman y McNeill 2006; Fernandez y Torres-Aleman 2012). Recientemente, además, se ha descrito que IGF-I puede provocar la fosforilación de CREB a través de la vía de la MAP quinasa induciendo la proliferación de células gliales (Yan et al. 2013).

Funciones de IGF-I

IGF-I es un factor pleiotrófico de manera que está implicado en múltiples procesos, por lo que su acción va a depender del tipo celular al que afecte, del momento del desarrollo y de la concentración, entre otros.

IGF-I es importante desde los primeros momentos de la gestación ya que incrementa el porcentaje de embriones implantados correctamente en el útero (O'Kusky y Ye 2012). Además, IGF-I es necesario para el correcto crecimiento prenatal y la supervivencia postnatal. Este hecho se ve reflejado en el menor tamaño que presentan los ratones que carecen de *Igf-I* (reducción del 60%) o del *IGF-IR* (del 45%) comparado con sus hermanos control en el momento del nacimiento. Sin embargo, los animales LID (del inglés *Liver IGF-1-deficient*), los cuales carecen de IGF-I en el hígado, poseen un tamaño corporal similar a los animales control, lo que sugiere que IGF-I afecta al

crecimiento de manera autocrina/paracrina (Yakar et al. 2002). Además, los ratones KO para *Igf-I* mueren en un corto periodo de tiempo después de nacer, debido a un fallo pulmonar, aunque no en todas las cepas de ratones, la falta de IGF-I influye de la misma manera (letalidad del 95% en la cepa C57B/6 mientras que en 129/MF1 es del 3,5%) (Liu et al. 1993; Hurtado-Chong et al. 2009). Otros órganos afectados por la falta de IGF-I son los músculos, el cerebro, el hueso o la piel, ya que los ratones KO presentan hipoplasia muscular, menor tamaño cerebral y menor desarrollo en los centros de osificación faciales y craneales (Baker et al. 1993; Liu et al. 1993; Powell-Braxton et al. 1993; Beck et al. 1995; Pichel et al. 2003). Postnatalmente, los animales KO presentan una reducción del tamaño corporal y cerebral, menor desarrollo de los centros de osificación de los huesos largos, infertilidad y sordera (Baker et al. 1993; Leon et al. 1995; Wang et al. 1999; Yakar et al. 2002; Stratikopoulos et al. 2008; Wu et al. 2009; O'Kusky y Ye 2012).

Los ratones KO para IGF-I tienen un cerebro de menor tamaño, con alteraciones en estructuras cerebrales, en los procesos de mielinización y crecimiento dendrítico y axonal, además de en la captación de glucosa. Por el contrario, ratones que sobreexpresan IGF-I presentan macrocefalia (Beck et al. 1995; Pichel et al. 2003; Russo et al. 2005; Fernandez y Torres-Aleman 2012; O'Kusky y Ye 2012). Durante el desarrollo del SNC, IGF-I afecta a la proliferación de los progenitores neurales, supervivencia y diferenciación de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (estas cuestiones se abordaron en detalle a continuación).

En humanos se ha visto que la deficiencia de IGF-I durante la gestación produce un retraso severo de crecimiento. Además, la deficiencia congénita de *IGF-I* o *IGF-IR* se encuadra dentro del síndrome de Laron, en el que se incluyen también la deficiencia en *GHR* o en las vías de señalización de *GH* o *IGF-I*. Los individuos que presentan este síndrome tienen un menor crecimiento al nacer que se hace más acusado con la edad, menor tamaño cerebral, menor tamaño del corazón, acromicria, menor desarrollo muscular y osteopenia, entre otras afecciones (Puche y Castilla-Cortazar 2012). También se ha descrito una duplicación de cuatro nucleótidos en el gen de *Igf-I* que produce una reducción de los niveles de IGF-I, y como resultados los individuos que la presentan tienen una menor estatura y microcefalia (van Duyvenvoorde et al. 2010).

Proliferación celular

Numerosos estudios han demostrado que IGF-I promueve la proliferación de células neurales, incluyendo células del linaje neuronal, astrocítico y oligodendrocítico (Ye y D'Ercole 2006). Durante el desarrollo embrionario, IGF-I promueve la proliferación de los progenitores del neuroepitelio observado tanto en estudios *in vitro* (Hernandez-Sanchez et al. 1995; Arsenijevic et al. 2001; Vicario-Abejón et al. 2003; Magarinos et al. 2010) como *in vivo* (Popken et al. 2004; Hu et al. 2012). Este efecto de IGF-I en la proliferación celular también se observa postnatalmente (Aberg et al. 2000; Gago et al. 2003; Popken et al. 2004; Kalluri et al. 2007; Hurtado-Chong et al. 2009; Kouroupi et al. 2010; Perez-Martin et al. 2010). En ratones que sobreexpresan IGF-I regulado por el promotor de Nestina, de manera que es activo en los progenitores neurales, se ha observado un incremento del tamaño cerebral tanto a E18 como postnatalmente. Además, los ratones que sobreexpresan IGF-I presentaron un aumento del número de células proliferativas en el neuroepitelio a E14 (Popken et al. 2004). Este aumento de la proliferación celular es debido a un

acortamiento de la duración del ciclo celular, disminuyendo la fase G_1 e incrementando la entrada en ciclo de las células hijas (Hodge et al. 2004).

Durante el desarrollo del BO, IGF-I regula la proliferación de las células madre y progenitores. Este hecho se pone de manifiesto en cultivos de CMBOe tratados con IGF-I, en los que aumenta el número células proliferativas y el número de neurosféricas formadas comparado con los cultivos control. Sin embargo, cuando las CMBO son obtenidas de embriones KO para IGF-I no se observan diferencias en el porcentaje de células BrdU⁺ (5-bromo-2-desoxiuridina) comparado con las células aisladas de sus hermanos WT (Vicario-Abejón et al. 2003). En el individuo adulto, IGF-I promueve la proliferación de las células madre y progenitores de la ZSV, ya que los ratones KO para IGF-I presentan un menor número de células en mitosis en la ZSV comparado con los animales control (Hurtado-Chong et al. 2009).

IGF-I también afecta la proliferación celular en el GD del HP. En cultivos de progenitores del GD de ratas adultas tratados con IGF-I, se observa un aumento del número de células en división (Aberg et al. 2003). Adicionalmente, en animales en los que se ha administrado IGF-I periféricamente se produce un incremento del número de células BrdU⁺ en el GD (Aberg et al. 2000). Efecto similar se observa en animales sometidos a ejercicio físico, lo que induce un aumento de la entrada de IGF-I al cerebro (Trejo et al. 2001; Trejo et al. 2008; Glasper et al. 2010). Sin embargo, en animales carentes de IGF-I se ha encontrado un incremento del número de células proliferativas en el GD (Cheng et al. 2001). De manera que los distintos estudios muestran efectos contrarios mediados por IGF-I en la proliferación en el GD.

Supervivencia celular

IGF-I favorece la supervivencia celular ya que inhibe la apoptosis, tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*. Este efecto de IGF-I se ha observado en múltiples tipos celulares del SN como en células de corteza, células del Purkinje o progenitores neurales óticos, entre otros (Gago et al. 2003; Hodge et al. 2007; Croci et al. 2010; Aburto et al. 2012). En el GD, se ha visto que la falta de IGF-I provoca un aumento del número de células muertas y una menor supervivencia de las neuronas formadas (Cheng et al. 2001; Lichtenwalner et al. 2006; Liu et al. 2009).

Además, podría prevenir la muerte neuronal producida en enfermedades neurodegenerativas como en Alzheimer ya que IGF-I podría controlar la acumulación de β amiloide y proteína Tau (Carro et al. 2002; Puche y Castilla-Cortazar 2012). Sin embargo, en otros estudios se ha descrito que IGF-I podría promover la producción de β amiloide (Araki et al. 2009). Por ello, aún no se conoce totalmente la implicación de IGF-I en la enfermedad de Alzheimer.

Migración celular

IGF-I también se ha relacionado con la migración de algunos tipos celulares. Por ejemplo, en cultivos de la línea celular del neuroblastoma, se ha descrito que IGF-I estimula la migración e invasión de las células (Puglianiello et al. 2000; Russo et al. 2005). La primera demostración de que IGF-I promovía la migración celular *in vivo* fue descrita por Hurtado-Chong et al. mediante el análisis de ratones KO para *Igf-I* y el cultivo de explantes celulares. Estos estudios demostraron que IGF-I es necesario para la salida de neuroblastos desde la ZSV hasta el BO y para su posterior migración radial

en el propio BO (Hurtado-Chong et al. 2009). Además, estos efectos son mediados por la activación de la vía de la PI3K por IGF-I, y por la fosforilación de la proteína adaptadora Dab1 (proteína adaptadora de la vía de la relina, implicada en migración) que activará la Src quinasa (Hurtado-Chong et al. 2009). Posteriormente, IGF-I se ha relacionado con la migración de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Xiang et al. 2011) y del cerebelo (Li et al. 2012) de roedores o células de la cresta neural en el pez zebra (Onuma et al. 2011). Por el contrario, se desconoce el papel de IGF-I en la migración y el posicionamiento de las neuronas en el GD, hecho que ha sido abordado en esta tesis.

Diferenciación y maduración neuronal

Asimismo, IGF-I favorece la maduración y diferenciación de las CMN y los progenitores a los distintos linajes neurales (Ye y D'Ercole 2006). En ratones carentes de IGF-I se ha descrito una reducción del número de neuronas y oligodendrocitos durante el desarrollo embrionario y postnatal (Baker et al. 1993; Liu et al. 1993; Powell-Braxton et al. 1993; Beck et al. 1995; Hurtado-Chong et al. 2009). Por el contrario, animales que sobreexpresan *Igf-I* presentan un aumento de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (O'Kusky et al. 2000; Popken et al. 2004).

En el BO, IGF-I favorece la diferenciación celular. En cultivos de CMBOe tratados con IGF-I se produce un incremento en el número de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, mientras que cuando las células son obtenidas de embriones carentes de *Igf-I* se obtienen un número menor comparado con las obtenidas de sus hermanos WT (Vicario-Abejón et al. 2003; Otaegi et al. 2006). En el BO adulto de animales KO para *Igf-I*, se observa una reducción del número de neuronas TH⁺, calbindina⁺, calretinina⁺ o parvalbúmina⁺, posiblemente por una alteración de la migración de los neuroblastos desde la ZSV (Hurtado-Chong et al. 2009). Por otro lado, se ha demostrado que IGF-I aumenta el número de oligodendrocitos en el HP, tanto en cultivos de CMHPa tratados con IGF-I como en células que sobreexpresa *Igf-I in vivo* mediante inyección de virus adenoasociados (Hsieh et al. 2004). Sin embargo, en otros estudios han observado que en cultivos de CMHPa tratados con IGF-I se produce un incremento en el número de neuronas, sin afectarse la población de astrocitos ni de oligodendrocitos (Aberg et al. 2003). Un efecto similar se obtuvo en animales administrados con IGF-I periféricamente, en animales que sobreexpresan *Igf-I* o por un aumento en los niveles de IGF-I inducidos por ejercicio (Aberg et al. 2000; O'Kusky et al. 2000; Trejo et al. 2001). A pesar de todo lo descrito anteriormente, no se conocen totalmente los mecanismos celulares por los cuales IGF-I favorece la neurogénesis hipocampal adulta.

Por último, IGF-I puede regular la maduración neuronal, afectando el crecimiento dendrítico y axonal, y al establecimiento de sinapsis en neuronas de distintas áreas, de manera independiente de la supervivencia celular. Así, los animales KO para *Igf-I* presentan un menor desarrollo de los axones que constituyen los nervios periféricos (Gao et al. 1999), una inervación alterada de las células sensoriales del órgano de Corti (Camarero et al. 2001) y una menor densidad de espinas en neuronas de la capa II-III de la corteza (Cheng et al. 2003). En el BO de ratones KO para *IGF-IR* se observa un patrón alterado en las proyecciones de los axones de las NOS, ya que IGF-I actúa como quimioatrayente para el crecimiento del cono axonal de estas neuronas (Scolnick et al. 2008). En el HP, IGF-I está involucrado en el establecimiento de la polaridad de la neurona y la iniciación del crecimiento del cono axonal, a través de la activación de la vía de Akt (Laurino et al. 2005; Sosa et al.

2006). A pesar de que la estructura del cerebelo está preservado en ratones carentes de *Igf-I* a la edad de E18,5 (Vicario-Abejon et al. 2004), en el desarrollo postnatal, se ha demostrado que IGF-I promueve el establecimiento de sinapsis cerebelosas mientras que la ausencia de IGF-I facilita su eliminación (Kakizawa et al. 2003). Asimismo, en cultivos de neuronas corticales, IGF-I promueve la formación de sinapsis (Corvin et al. 2012).

Por otro lado, el aumento de los niveles de IGF-I, asociados al ejercicio físico en animales adultos, produce un aumento de la densidad de espinas en las dendritas basales de las neuronas piramidales de CA1 pero no afecta a las neuronales grano del GD ni a las neuronas piramidales de CA3 (Glasper et al. 2010). Paralelamente, cuando IGF-I es administrado mediante infusión ventricular no se observó ningún efecto en el número de sinapsis en CA3 (Poe et al. 2001). Sin embargo, estudios en animales transgénicos demostraron que la sobreexpresión de *Igf-I* produce un incremento en el número de sinapsis en el GD de ratones postnatal (O'Kusky et al. 2000), mientras que una disminución de los niveles séricos de IGF-I produce una reducción del número de botones glutamatérgicos (Trejo et al. 2007).

Los distintos estudios descritos muestran una cierta controversia en el papel de IGF-I durante la formación de sinapsis, por lo que en esta tesis analizaremos el papel de IGF-I en la sinaptogénesis del BO y el HP durante el desarrollo embrionario.

5.2. Neurotrofinas

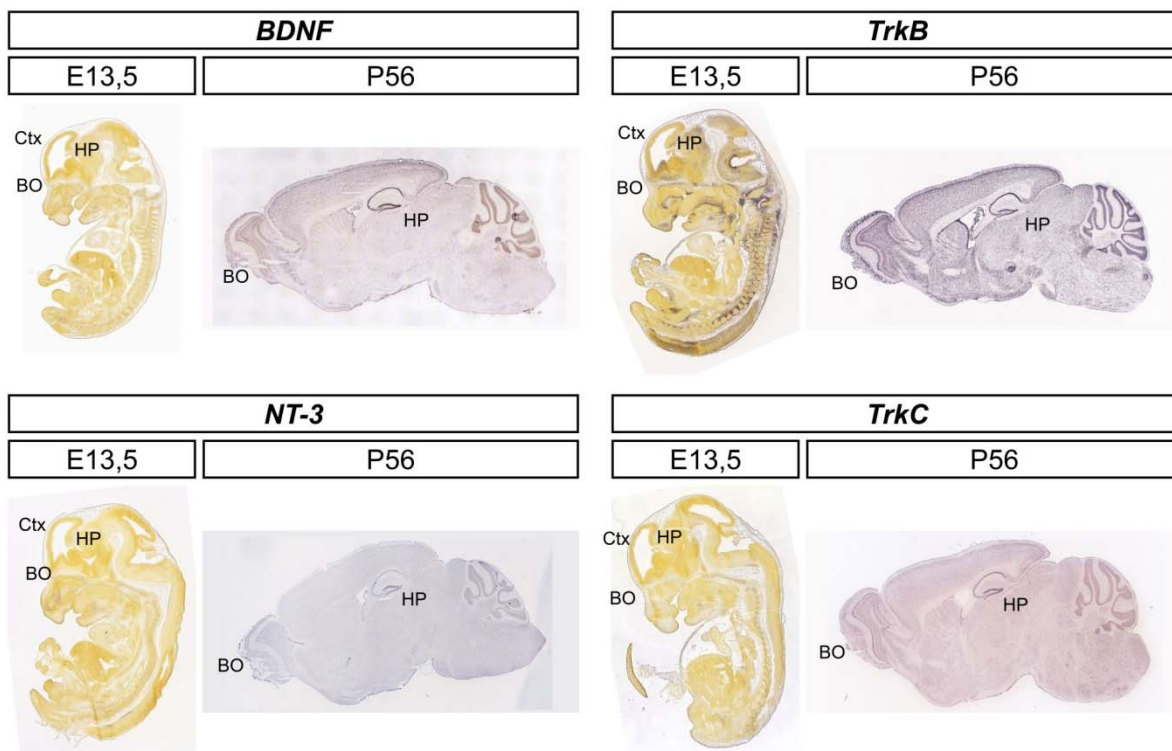
En mamíferos, se han identificado cuatro neurotrofinas: el factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés *nerve growth factor*), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*), la neurotrofina 3 (NT-3, del inglés *neurotrophin 3*) y la neurotrofina 4 (NT-4, del inglés *neurotrophin 4*) (Barde et al. 1982; Leibrock et al. 1989; Vicario-Abejón et al. 2002; Chao 2003; Reichardt 2006; Park y Poo 2013).

Las neurotrofinas se unen a uno o más miembros de una familia de receptores tirosina quinasa denominados Trk (del inglés *tropomyosin-related kinase*). Existen tres receptores diferentes, los cuales presentan diferente afinidad por cada uno de las neurotrofinas; de manera que NGF se une preferentemente a TrkA, BDNF y NT-4 a TrkB y NT-3 a TrkC. Además, todas las neurotrofinas pueden activar el receptor de neurotrofinas p75 (p75NTR) (Ullrich et al. 1999; Vicario-Abejón et al. 2002; Chao 2003; Reichardt 2006; Park y Poo 2013). Las pro-neurotrofinas son ligandos más selectivos para p75NTR mientras que las formas maduras activan específicamente los receptores Trk.

Los receptores Trk presentan un dominio extracelular caracterizados por zonas ricas en cisteína seguidas de tres repeticiones ricas en leucina, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad tirosina quinasa. La unión de las neurotrofinas al receptor provoca su dimerización y activación por autofosforilación. Las neurotrofinas interaccionan con su receptor por un dominio proximal similar a inmunoglobulinas (Urfer et al. 1998; Chao 2003; Reichardt 2006).

Alteraciones en la producción de las neurotrofinas o en sus receptores se han relacionado con algunas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o desórdenes psiquiátricos, como depresión, desórdenes bipolares o esquizofrenia (Chao 2003). De hecho, se ha descrito en humanos un polimorfismo en BDNF producido por la sustitución de una metionina en posición 66 por una valina, responsable de alteraciones cognitivas en pacientes con esquizofrenia (Zhang et al. 2012).

A



Allen Brain Atlas

B

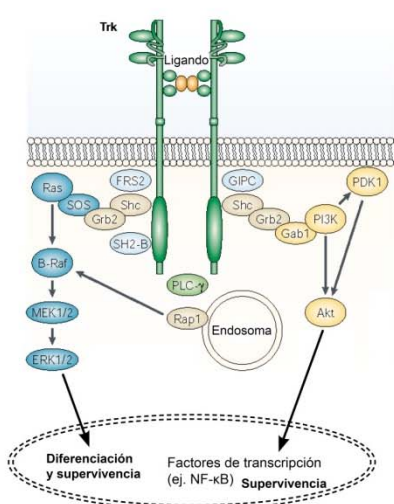


Figura 10: Expresión de las neurotrofinas BDNF y NT-3 y sus receptores Trk en el SN y esquema de sus vías de señalización. (A) Las imágenes corresponden con hibridaciones *in situ* realizadas en secciones sagitales de tejido embrionario y adulto para detectar la expresión de *Bdnf*, *Nt-3*, *TrkB* y *TrkC*. **(B)** Esquema simplificado de las principales vías de señalización intracelular y los efectos celulares producidos por la unión de las neurotrofinas a sus receptores Trk. Las neurotrofinas también pueden unirse al receptor p75NTR aunque en esta tesis nos hemos centrado en las acciones mediadas por la unión a los receptores Trk en la maduración morfológica y sináptica. BO=Bulbo olfatorio; Ctx=corteza cerebral; HP=hipocampo.

Modificado de Chao et al. 2003
y Reichardt 2006

5.2.1. Expresión de BDNF y NT-3

Las neurotrofinas y sus receptores se expresan abundantemente en todo el SN tanto durante el desarrollo embrionario como en la edad postnatal (Fig. 10 A), siendo sintetizadas tanto por neuronas como por astrocitos. Además, los niveles de expresión están muy regulados y varían según la actividad neuronal o en respuesta a una lesión (Chao 2003; Reichardt 2006; Park y Poo 2013).

BDNF se ha detectado en todas las regiones del cerebro estudiadas, encontrándose los niveles más altos en el hipocampo y en la corteza. Sin embargo, la expresión de NT-3 está más restringida a áreas del hipocampo y del cerebelo. Además, NT-3 se expresa en tejidos no nerviosos como los riñones, las glándulas submandibulares y los ovarios (Ernfors et al. 1990b; Hofer et al. 1990; Ceccatelli et al. 1991; Conner et al. 1997; Martinez et al. 1998; Malkovska et al. 2006).

TrkB puede detectarse desde mitad de la gestación (\approx E14 ratón) y continúa durante toda la vida del individuo. Preferentemente, su expresión se produce en tejido cerebral, aunque también se puede detectar en pulmón, músculo y ovarios (Klein et al. 1989; Deckner et al. 1993; Martinez et al. 1998; Bath et al. 2008). La expresión de TrkC comienza más tempranamente (\approx E9 ratón) y se mantiene en la edad adulta, no sólo en el SN sino también en otros tejidos como la aorta, las glándulas sublinguales y submaxilar (Deckner et al. 1993; Lamballe et al. 1994; Martinez et al. 1998).

5.2.2. Vías de señalización

Las principales vías de señalización mediadas por los receptores Trk, tras su activación por neurotrofinas, son la vía de la MAP quinasa, la vía PI3K quinasa que estimula Akt y la vía de PLC γ que moviliza las reservas de Ca⁺² (Fig. 10 B) (Chao 2003; Reichardt 2006; Park y Poo 2013).

La activación de la vía de la MAP quinasa se produce de manera similar que lo descrito para FGF-2 (ver apartado 5.1.1) e influye en la diferenciación neuronal y la supervivencia de varios subtipos neuronales (Bonni et al. 1999; Reichardt 2006).

La fosforilación de Akt controla la actividad de varias proteínas importantes para la supervivencia celular como caspasas que intervienen en la apoptosis, entre las que se incluyen Bad o Bcl-2 y regula la actividad de diversos factores de transcripción (Brunet et al. 2001). Además, la activación de Akt también promueve el crecimiento axonal y la diferenciación neuronal (Yuan et al. 2003) (Fig. 10 B).

El efecto de las neurotrofinas en la diferenciación y maduración neuronal se revisan en detalle en el apartado siguiente.

5.2.3. Funciones de BDNF y NT-3

Las neurotrofinas participan en el desarrollo de los circuitos neuronales, regulando la supervivencia y diferenciación de las neuronas, el desarrollo de axones y dendritas, así como la formación y maduración de sinapsis y el refinamiento de los circuitos (Vicario-Abejón et al. 2002; Park y Poo 2013). En esta tesis nos hemos centrado en estudiar el papel de BDNF y NT-3 en la maduración morfológica y sináptica de neuronas derivadas de CMBOe.

Supervivencia y diferenciación neuronal

Las neurotrofinas juegan un papel importante en la diferenciación de CMNs embrionarias. En cultivos de células del estriado embrionario tratados con BDNF se observó un aumento del número total de neuronas, las cuales poseían un mayor desarrollo neurítico, a las dos semanas *in vitro*, mientras que una semana después no había diferencias entre los cultivos control y los tratados, probablemente debido a que BDNF no es capaz de prevenir la pérdida neuronal a lo largo del tiempo (Ahmed et al. 1995). Efecto similar en la promoción del crecimiento neurítico se obtuvo al añadir BDNF en cultivos de CMNs obtenidas a partir de tejido del estriado o del hipocampo de ratones postnatales, los cuales presentaron neuronas con una longitud dendrítica mayor y un mayor desarrollo axonal. Por el contrario, cuando los cultivos son tratados con NT-3 no se observaron efectos. Sin embargo, las células obtenidas a partir de otros tejidos nerviosos como el cerebelo o la corteza no presentaron diferencias al ser expuestas a BDNF comparado con los cultivos control (Shetty y Turner 1998). En otro estudio en el que CMNs aisladas de HPs embrionarios se cultivaron en presencia de BDNF y NT-3, se observó que ambas neurotrofinas promovían la diferenciación a neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas funcionales a nivel sináptico (Vicario-Abejón et al. 1995; Vicario-Abejón et al. 2000). Todos estos estudios demuestran que las neurotrofinas promueven la supervivencia y diferenciación de manera distinta en función del tipo celular y del momento de desarrollo en el que actúan.

Este efecto de BDNF en la diferenciación y supervivencia neuronal también se ha demostrado en estudios *in vivo*, ya que animales KO para *Bdnf* presentan una deficiencia de determinados subtipos neuronales en la corteza, el hipocampo o el estriado (Jones et al. 1994; Waterhouse et al. 2012). En el BO, la falta de *TrkB* provoca una pérdida de neuronas periglomerulares dopaminérgicas (Galvão et al. 2008).

Las neurotrofinas también regulan la diferenciación y supervivencia neuronal durante la neurogénesis adulta en el GD y en la ZSV. En estudios en los que se transducían células de la ZSV con un vector adenoviral para sobreexpresar *Bdnf* o se administraba BDNF intraventricularmente, se observó un aumento de las neuronas incorporadas en el BO hasta tres semanas después de la inyección (Zigova et al. 1998; Benraiss et al. 2001). En esta misma línea, animales con secreción de BDNF alterada exhiben una menor supervivencia de las nuevas neuronas formadas en el BO (Bath et al. 2008). Sin embargo, en otros estudios en los que BDNF se administraba intraventricularmente, no se observaron cambios en el número de neuronas en el BO (Galvão et al. 2008). Adicionalmente, se ha demostrado que concentraciones bajas de BDNF estimulan la migración de células de la ZSV mientras que concentraciones altas favorecen la diferenciación celular (Chiamarello et al. 2007; Petridis y El Maarouf 2011). Por otro lado, en el GD de animales que presentan una menor expresión de *Bdnf* o expresan una variante no funcional del *TrkB*, se observó una menor supervivencia y diferenciación neuronal (Sairanen et al. 2005). Estas diferencias entre los efectos observados en los distintos estudios, podrían ser debidas a variaciones en la concentración de BDNF en la ZSV o el GD.

Crecimiento de axones y dendritas

En cultivos de neuronas obtenidas a partir de HPs embrionarios, se ha demostrado que BDNF favorece la diferenciación de una determinada neurita en un axón (Shelly et al. 2007). De hecho, la unión de BDNF a su receptor, incrementa los niveles endógenos de BDNF en esa neurita, de manera que, además de la estimulación de la diferenciación en axón de la neurita por el BDNF exógeno, se promueve su crecimiento por el aumento de los niveles endógenos (Cheng et al. 2011).

Además, las neurotrofinas pueden tener un efecto quimioatrayente para los conos de crecimiento axonal o favorecer el crecimiento de las dendritas de las neuronas adyacentes (Paves y Saarma 1997; Tucker et al. 2001; Horch y Katz 2002). Sin embargo, en animales que carecen de *TrkB* o *TrkC*, no se observaron diferencias en los patrones de proyecciones de los axones de las vías eferentes que llegan al HP desde la corteza entorrinal, a pesar de poseer una menor arborización (Martinez et al. 1998). Asimismo, se ha descrito que BDNF promueve el crecimiento axonal de las neuronas grano del cerebelo (Segal et al. 1995).

Notablemente, los distintas neurotrofinas pueden tener efectos contrarios en distintos subtipos neuronales. Este hecho se ha descrito en neuronas de la capa 4 de la corteza cerebral en las que BDNF estimula el crecimiento dendrítico, mientras que NT-3 lo inhibe. Sin embargo, en neuronas de la capa 6 el efecto observado es el reverso (McAllister et al. 1997). En neuronas GABAérgicas aisladas a partir de HPs de rata, BDNF y NT-3 promueve el desarrollo de ramas dendríticas, aumentando su número y su longitud. BDNF, además, favorece el crecimiento del axón e incrementa el tamaño del soma (Vicario-Abejon et al. 1998; Yamada et al. 2002). En concordancia con este resultado, rodajas de HPs postnatales cultivadas en presencia de BDNF presentan una mayor inmunoreactividad contra GAD que los cultivos control (Marty et al. 2000).

En el BO se ha demostrado que la carencia de BDNF disminuye el número y la complejidad dendrítica de neuronas parvoalbúmina⁺ (Berghuis et al. 2006). Por el contrario, en cultivos de neuronas derivadas de CMBOe, BDNF favorece la maduración neuronal, ya que las neuronas tratados con BDNF poseían una morfología más compleja y un mayor número de botones (Vergaño-Vera et al. 2006). Posteriormente, se describió en estudios *in vitro* que BDNF, pero no NT-3, promueve el crecimiento dendrítico de las células mitrales y empenachadas del BO (Imamura y Greer 2009). Además, BDNF induce rápidamente cambios morfológicos en las espinas de las neuronas de las CPE y de la CCG del BO, disminuyendo el diámetro de los filopodios, lo que podría reflejar un aumento del recambio de las espinas por la acción de BDNF (Matsutani y Yamamoto 2004). Sin embargo, no se ha realizado un estudio detallado a nivel morfológico ni sináptico que permita evaluar el papel de BDNF en la maduración de neuronas del BO.

Formación y maduración de sinapsis

Las neurotrofinas también regulan la maduración morfológica y funcional de las sinapsis, así como la estabilización de las sinapsis existentes (Vicario-Abejón et al. 2002; Park y Poo 2013).

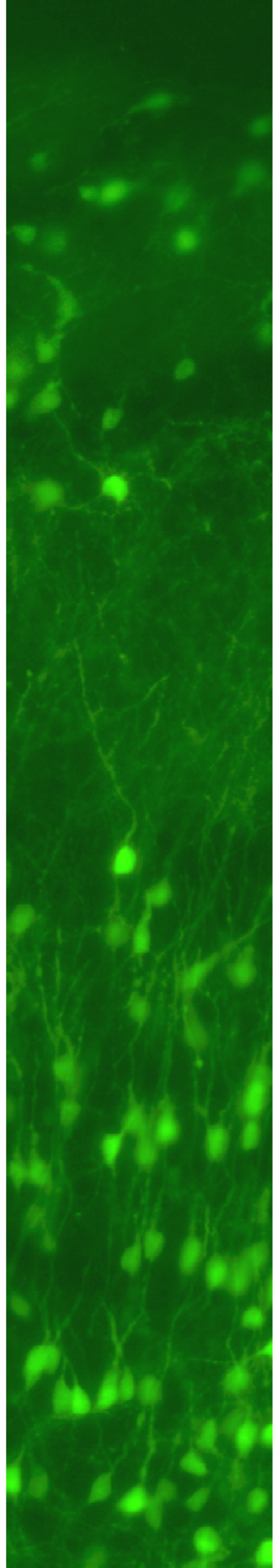
Las primeras evidencias de la acción de las neurotrofinas durante la formación de sinapsis independientemente de su papel en supervivencia, se observaron en el HP de ratones KO para *TrkB* y *TrkC* (Martinez et al. 1998) y en cultivos de neuronas de hipocampo (Vicario-Abejon et al. 1998). Los

ratones carentes de TrkB y TrkC tenían un menor número de contactos sinápticos con respecto a los animales control. Además, los ratones KO de TrkB poseían botones presinápticos más grandes pero que contenían un número menor de vesículas sinápticas comparado con sus hermanos control, mientras que los mutantes de *TrkC* no presentaron diferencias significativas en el tamaño de los botones (Martinez et al. 1998). Por otro lado, BDNF favorece la aparición de corrientes postsinápticas excitadoras e inhibitoras, mientras que NT-3 induce predominantemente corrientes excitadoras en neuronas aisladas a partir de hipocampos embrionarios (Vicario-Abejon et al. 1998). Sin embargo, en dichos estudios no se observaron cambios en la formación de espinas dendríticas ni en la morfología de los botones sinápticos, aunque éstos presentaban un incremento en el número de vesículas (Vicario-Abejon et al. 1998; Collin et al. 2001). Paralelamente, en cultivos organotópicos de rodajas de HP postnatal, BDNF incrementa la formación de vesículas sinápticas y la formación de espinas dendríticas en las neuronas piramidales de CA1 (Tyler y Pozzo-Miller 2001). Por el contrario, las neuronas obtenidas del HP de embriones E18,5 carente de BDNF poseen un menor número de botones vGlut (Singh et al. 2006).

Resultados similares en el desarrollo de sinapsis, tanto a nivel pre como postsináptico, se han descrito en el cerebelo, la corteza o la retina, de manera que animales que carecen de TrkB presentan un menor marcaje GABAérgico y un menor número de botones sinápticos, mientras que la sobreexpresión de BDNF promueve el desarrollo de espinas dendríticas (Horch et al. 1999; Rico et al. 2002; Sanchez et al. 2006; Sanchez-Huertas y Rico 2011). En la corteza se ha demostrado que los niveles de BDNF controlan la transcripción del gen *GAD65* a través de la vía Ras-Erk-Cre (Sanchez-Huertas y Rico 2011).

En el BO, BDNF incrementa la excitabilidad de las neuronas mitrales (Mast y Fadool 2012), aunque se desconoce el efecto de BDNF y NT-3 durante la formación de los botones sinápticos en el BO, pregunta que hemos abordado en esta tesis.

Objetivos

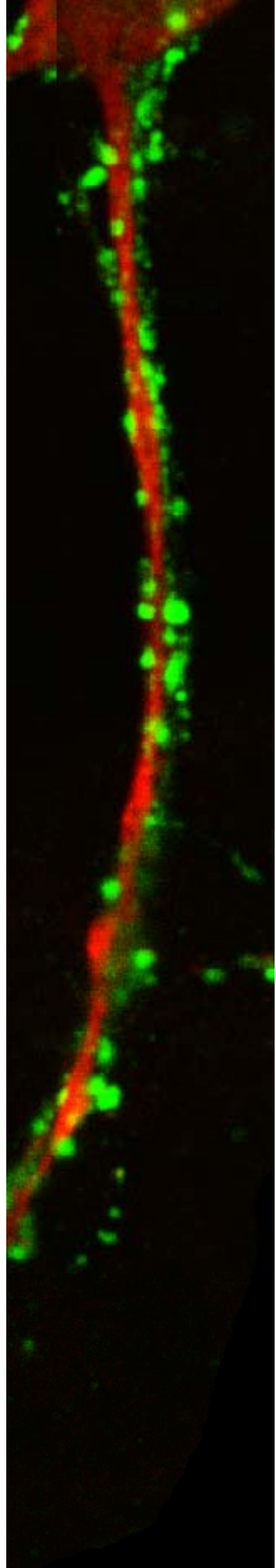


El objetivo general de esta tesis ha sido estudiar el papel de varios factores extracelulares que se unen a receptores tirosina quinasa en la neurogénesis embrionaria y adulta, desde el mantenimiento y proliferación de células madre neurales y progenitores hasta la diferenciación y maduración de distintos tipos neuronales.

Los objetivos específicos fueron:

1. Determinar el papel de los factores de crecimiento FGF-2 y EGF durante la proliferación, supervivencia y diferenciación de células madre neurales de bulbo olfatorio (CMBO) embrionario y adulto, así como los cambios de expresión génica asociados a dichos procesos.
2. Analizar el efecto de BDNF y NT3 en la maduración morfológica y sináptica de los distintos subtipos neuronales derivados de CMBO embrionario.
3. Estudiar la regulación de la sinaptogénesis por IGF-I en el BO y en el HP durante el desarrollo embrionario.
4. Estudiar la función de IGF-I en el mantenimiento de las células madre neurales y progenitores, y en la diferenciación, posicionamiento y maduración neuronal en el GD durante la neurogénesis adulta, así como los mecanismos de acción implicados.

Material y Métodos



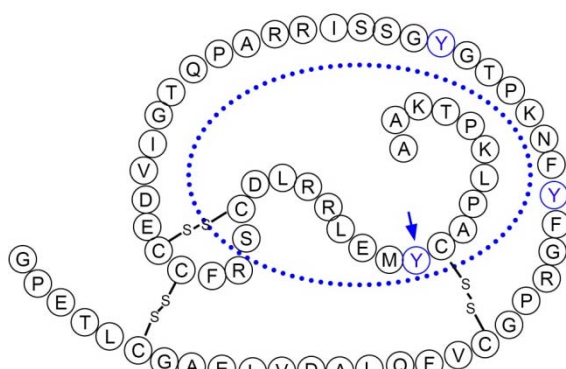
1. Líneas de ratones empleadas y mantenimiento

1.1. Ratones transgénicos

1.1.1. Ratón *Knock-Out* global para IGF-I

Para estudiar el efecto del factor de crecimiento IGF-I durante la neurogénesis y la sinaptogénesis embrionaria y adulta, se empleó una línea de ratones mutantes Knock-out (KO) que carecen de dicho factor (Liu et al. 1993). Esta línea de ratones se mantuvo en dos fondos genéticos distintos, MF1 y C57Bl/6N. En la cepa C57Bl/6N la supervivencia postnatal es nula, probablemente debido a un menor desarrollo pulmonar en el momento del nacimiento. Por tanto, los estudios postnatales fueron realizados en la cepa MF1 y los embrionarios en la cepa C57Bl/6N, como ya se hizo en anteriores estudios de nuestro laboratorio (Hurtado-Chong et al. 2009).

Estos ratones mutantes se obtuvieron mediante el reemplazo de una porción del exón 4 del gen *Igf-I* por un casete de neomicina-tirosina quinasa para la selección positiva-negativa (Fig. 11). La región deletcionada (desde el aminoácido 51 al 70) incluye un residuo importante de tirosina (posición 60) y un par de puentes disulfuro, resultando una proteína truncada que carece de actividad fisiológica en todas las células del organismo (Liu et al. 1993).



Modificado de Liu et al. 1993

Figura 11: Esquema de la estructura de la proteína IGF-I. En la imagen se muestra una representación de la cadena de aminoácidos del factor de crecimiento IGF-I. Dentro de la elipse azul se encuentran los aminoácidos deletcionados (51-70) en el ratón KO. Los círculos azules señalan la presencia de tirosinas, necesarias para la unión con el receptor, y la flecha azul indica el residuo de tirosina en posición 60, incluido en la parte eliminada en el ratón KO. También, se pueden observar 3 puentes disulfuro, importantes para mantener la estructura terciaria de la proteína.

Consideramos animales salvajes o *wild-type* (WT o *Igf-I*^{+/+}) aquellos que poseen los dos alelos del gen *Igf-I* sin deletcionar, heterocigotos (HT o *Igf-I*^{+/-}) aquellos en los que se ha deletcionado uno de los alelos del gen de *Igf-I* y KO (*Igf-I*^{-/-}) aquellos que carecen de las dos copias del gen de *Igf-I*.

El genotipaje de los ratones se llevó a cabo por PCR (de las siglas en inglés *polymerase chain reaction*, ver apartado 1.3 de Material y Métodos).

El mantenimiento de la colonia se realizó cruzando animales heterocigotos entre sí, de acuerdo con la normativa europea (directiva 86/609/EEC) y siguiendo la normativa bioética del CSIC (certificada en los proyectos BFU2007-61230 aprobado en Junio de 2007 y BFU2010-1963 en Septiembre de 2010). Para los estudios en etapas embrionarias, se consideró el día de visualización del tapón vaginal como E0,5.

Todos los animales fueron mantenidos en las instalaciones del Instituto Cajal, CSIC (Madrid) con administración de comida *ad libitum* en ambiente controlado, con ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y temperatura (22 °C) y humedad (44%) constante.

1.1.2. Ratón *Knock-out* condicional para IGF-I

Además del ratón KO global para IGF-I, quisimos generar una línea de ratones que careciera de IGF-I únicamente en las células de origen nervioso. De esta manera, podríamos prevenir la muerte de los ratones KO ocasionada por la falta de maduración pulmonar (Pichel et al. 2003) y estudiar específicamente el papel del IGF-I cerebral. Este transgénico se generó mediante el cruce de dos líneas de ratones: la línea *Igf-I* loxP y la Nestina-Cre.

Ratón *Igf-I* loxP

La línea de ratones *Igf-I* loxP fue obtenida gracias a la colaboración con el Dr. Derek LeRoith (Mount Sinai School of Medicine, NY, EEUU). Esta línea, además de la inserción del gen de la resistencia a neomicina dentro del exón 4 del gen de *Igf-I*, contiene, flaqueando esa región, las secuencias loxP (Liu et al. 1998) (Fig. 12). Estas secuencias loxP se caracterizan por ser reconocidas por la enzima viral Cre recombinasa (derivada del bacteriófago P1). Una vez reconocidas las secuencias, la enzima corta el ADN por los sitios loxP y une los fragmentos resultantes. De manera que sólo se eliminará el exón 4 de *Igf-I* en aquellas células donde se exprese la enzima Cre.

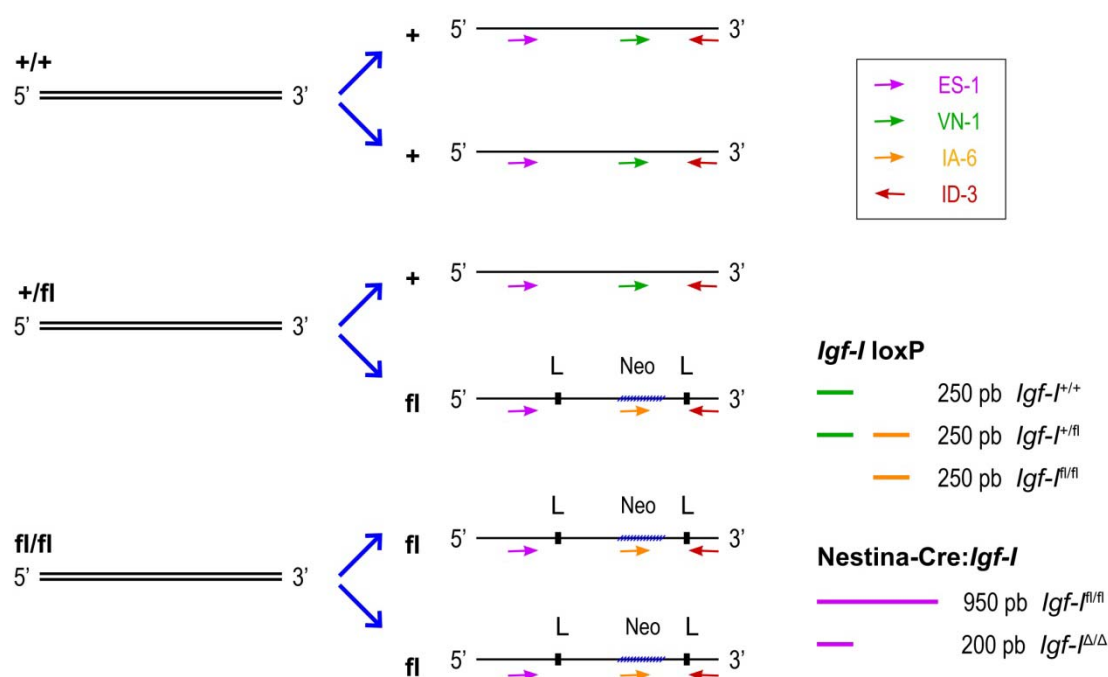


Figura 12: Representación del exón 4 del gen del *Igf-I* en ratones *Igf-I* loxP e Nestina-Cre:*Igf-I*. En el esquema se representan los distintos alelos de los ratones *Igf-I*^{+/+}, *Igf-I*^{+/fl} e *Igf-I*^{fl/fl}, incluyendo los sitios loxP (L) y el gen de la neomicina en los alelos mutantes. Las flechas indican el lugar de hibridación de los oligonucleótidos (ES-1, VN-1, IA-6 e ID-3) utilizados para el genotipaje por PCR de los ratones *Igf-I* loxP y Nestina-Cre:*Igf-I*. A la derecha, se ilustran las bandas obtenidas, y su tamaño, según el genotipaje.

Denominamos ratones *Igf-1^{+/+}* aquellos en los que no se ha modificado ninguno de los dos alelos del gen *Igf-1*, *Igf-1^{+/fl}* aquellos en los que en un alelo del gen se ha insertado el cassette con las secuencias loxP y *Igf-1^{fl/fl}* aquellos en los que se han modificado los dos alelos del gen de *Igf-1*.

El genotipaje de los ratones se llevó a cabo por PCR (ver apartado 1.3 de Material y Métodos).

El mantenimiento inicial de esta colonia se realizó cruzando ratones homocigotos para loxP (*Igf-1^{fl/fl}*) en la Transgenic Core Facility del National Institute of Mental Health (NIMH), NIH, EEUU, en colaboración con el Dr. James Pickel. Posteriormente, los ratones se trasladaron y mantuvieron en el animalario del Instituto Cajal, CSIC (Madrid).

Ratón Nestina-Cre

Para poder obtener un ratón KO específico de SN, necesitamos cruzar los ratones *Igf-1* loxP con otra línea que exprese la enzima Cre sólo en aquellas células de origen nervioso. Para lo cual, se eligió la línea Nestina-Cre, un ratón transgénico producido mediante la inserción del gen de la enzima Cre bajo el control del promotor y de un potenciador (*enhancer*) específico localizado en el segundo intrón del gen de la *nestina* que dirige la expresión de la proteína en el sistema nervioso (SN) (Zimmerman et al. 1994; Tronche et al. 1999).

La *nestina* también se expresa en progenitores del músculo durante el desarrollo (expresión que le confiere el primer intrón), por lo que para evitar esta producción fuera del SN y crear este ratón transgénico específico, se utilizó un vector que contenía un fragmento de 5359 pares de bases (pb) que incluía el promotor basal de la *nestina* y un fragmento de 653 pb de la porción conservada del segundo intrón de la *nestina* (que es el que confiere la expresión específica en progenitores neurales). De esta manera, se consiguió eliminar cualquier producción ectópica (Josephson et al. 1998; Panchision et al. 2001).

Los ratones Nestina-Cre fueron adquiridos en The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, EEUU) y mantenidos inicialmente en el NIMH, NIH. Posteriormente, se trasladaron al animalario del Instituto Cajal, CSIC (Madrid). Para el mantenimiento de esta línea, se cruzaron ratones hemigóticos para Nestina-Cre.

Aquellos ratones que expresen la enzima Cre (determinada por PCR) se denominarán Cre⁺ y los que carecen de ella Cre⁻.

Ratón ROSA26-YFP

Para comprobar que la producción de la enzima Cre era específica en la línea Nestina-Cre, se cruzó ésta con la línea reportera Rosa26-YFP (Srinivas et al. 2001). Esta colonia fue donada por el servicio del animalario del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid.

Estos ratones transgénicos contienen el gen *Yfp* (de las siglas en inglés *Yellow Fluorescent Protein*) insertado en el locus ROSA26. El vector utilizado para la inserción del gen contiene el gen *Yfp* precedido de un codón de parada que se encuentra flanqueado por sitios loxP (Fig. 13 A). En condiciones normales, en estos ratones no se expresa la proteína fluorescente, pero cuando se cruzan con ratones Nestina-Cre, el codón de parada se elimina por acción de la recombinada

detectándose la YFP en aquellas células que expresan Cre, es decir, teóricamente en las células que expresen nestina.

A



B

Nestina-Cre

Igf-1^{+/+} Cre^{+/-}

***Igf-1* loxP**

Igf-1^{fl/fl} Cre^{-/-}

x

F ₀	<i>Igf-1^{fl}</i> Cre ⁻	<i>Igf-1^{fl}</i> Cre ⁻
<i>Igf-1⁺</i> Cre ⁺	<i>Igf-1^{+/fl}</i> Cre ^{+/-}	<i>Igf-1^{+/fl}</i> Cre ^{+/-}
<i>Igf-1⁺</i> Cre ⁻	<i>Igf-1^{+/fl}</i> Cre ^{-/-}	<i>Igf-1^{+/fl}</i> Cre ^{-/-}

Igf-1^{+/fl} Cre^{+/-} x *Igf-1^{+/fl}* Cre^{+/-}

F ₁	<i>Igf-1⁺</i> Cre ⁺	<i>Igf-1⁺</i> Cre ⁻	<i>Igf-1^{fl}</i> Cre ⁺	<i>Igf-1^{fl}</i> Cre ⁻
<i>Igf-1⁺</i> Cre ⁺	<i>Igf-1^{+/+}</i> Cre ^{+/+}	<i>Igf-1^{+/+}</i> Cre ^{+/-}	<i>Igf-1^{+/fl}</i> Cre ^{+/+}	<i>Igf-1^{+/fl}</i> Cre ^{+/-}
<i>Igf-1⁺</i> Cre ⁻	<i>Igf-1^{+/+}</i> Cre ^{+/-}	<i>Igf-1^{+/+}</i> Cre ^{-/-}	<i>Igf-1^{+/fl}</i> Cre ^{+/-}	<i>Igf-1^{+/fl}</i> Cre ^{-/-}
<i>Igf-1^{fl}</i> Cre ⁺	<i>Igf-1^{+/fl}</i> Cre ^{+/+}	<i>Igf-1^{+/fl}</i> Cre ^{+/-}	<i>Igf-1^{fl/fl}</i> Cre ^{+/+}	<i>Igf-1^{fl/fl}</i> Cre ^{+/-}
<i>Igf-1^{fl}</i> Cre ⁻	<i>Igf-1^{+/fl}</i> Cre ^{+/-}	<i>Igf-1^{+/fl}</i> Cre ^{-/-}	<i>Igf-1^{fl/fl}</i> Cre ^{+/-}	<i>Igf-1^{fl/fl}</i> Cre ^{-/-}

Igf-1^{fl/fl} Cre^{+/-} x *Igf-1^{fl/fl}* Cre^{+/-}

F ₂	<i>Igf-1^{fl}</i> Cre ⁺	<i>Igf-1^{fl}</i> Cre ⁻
<i>Igf-1^{fl}</i> Cre ⁺	<i>Igf-1^{fl/fl}</i> Cre ^{+/+}	<i>Igf-1^{fl/fl}</i> Cre ^{+/-}
<i>Igf-1^{fl}</i> Cre ⁻	<i>Igf-1^{fl/fl}</i> Cre ^{+/-}	<i>Igf-1^{fl/fl}</i> Cre ^{-/-}

Igf-1^{fl/fl} Cre^{+/-} = *Igf-1^{Δ/Δ}*

Igf-1^{fl/fl} Cre^{-/-}
Igf-1^{+/fl} Cre^{-/-}
Igf-1^{+/+} Cre^{-/-}

Controles

Figura 13: Generación de un ratón condicional para IGF-I mediante el cruce de las líneas *Igf-1* loxP y Nestina-Cre. (A) En el esquema se representa el gen *Yfp* (en amarillo), precedido de un codón de parada (STOP, en rojo) flanqueado por los sitios loxP (L), en el locus Rosa 26 presente en la línea de ratones transgénicos reportera de la actividad de la enzima Cre recombinasa. (B) Las tablas muestran los cruces de las tres primeras generaciones necesarias para generar el ratón condicional de IGF-I a partir de las líneas *Igf-1* loxP y Nestina-Cre. En la segunda generación (F1) la probabilidad de obtener el ratón *Igf-1^{Δ/Δ}* es de un 16,67% y a partir de la tercera (F2) de un 66'67%. En la F0 se señalan con círculos verdes los animales *Igf-1^{+/fl}* utilizados para cruzar en la siguiente generación. En la F1 y F2 se señalan con círculos azules los animales *Igf-1^{Δ/Δ}* y rosas los ratones usados como control, con línea continua los que se han usado en la mayoría de los experimentos (*Igf-1^{fl/fl}*) y discontinúa los ratones utilizados con menor frecuencia (*Igf-1^{+/fl}* o *Igf-1^{+/+}*). Además, en rojo se indican aquellos ratones que no son viables al poseer doble dosis de la enzima Cre.

Para el mantenimiento de esta colonia, se cruzaron ratones homocigotos en el animalario del Instituto Cajal, CSIC (Madrid).

Nestin-Cre:Igf-I

Una vez establecidas las dos líneas de ratones transgénicos, la *Igf-I* loxP y la Nestina-Cre, se cruzaron machos y hembras *Igf-I*^{fl/fl} con machos y hembras Cre⁺, de manera que, a partir de la segunda generación se podrían obtener ratones que carecieran de sus dos copias del gen de *Igf-I* en el SN (Fig. 13 B).

Hemos usado como controles principalmente los ratones que tienen los sitios loxP insertados en el gen del *Igf-I* pero que no se ha delecionado al carecer de enzima Cre, por tanto *Igf-I*^{fl/fl} y, en menor medida, también los ratones *Igf-I*^{+fl} o *Igf-I*^{+/-}; y los ratones en los que ha eliminado el exón 4 del gen de *Igf-I* en los dos alelos serán los ratones KO condicionales y se denominarán *Igf-I*^{Δ/Δ}.

Los genotipajes se realizaron, a partir de fragmentos de cola, por PCR utilizando los mismos cebadores que para las líneas *Igf-I* loxP y Nestina-Cre por separado (ver apartado 1.3 de Material y Métodos).

Además, se comprobó por PCR cuantitativa la expresión de *Igf-I* (ver apartado 4.2.7 de Material y Métodos) en tejidos de cerebro, hígado, pulmón y corazón, así como en CMHP, fibroblastos y células de hígado. Además, se comprobó la deleción del fragmento del gen de *Igf-I* en el ADN extraído de CMHP, fibroblastos y células de hígado (ver apartado 1.3 de Material y Métodos).

1.1.3. Ratones GFP

Para algunos estudios se requirieron células marcadas genéticamente que obtuvimos de ratones GFP (de las siglas en inglés *Green Fluorescent Protein*) donados por el Dr. Antonio Bernad (actualmente en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, CNIC, Madrid).

En estos ratones transgénicos se han insertado al azar múltiples copias del gen *Gfp* (Okabe et al. 1997). De esta manera, la mayoría de las células del organismo expresan esa proteína, siendo así fluorescentes, con la excepción de eritrocitos y el pelo.

Para el mantenimiento de esta línea, se cruzaron ratones hemiciigóticos.

1.2. Ratones salvajes (no modificados genéticamente)

1.2.1. Cepa MF1

Periódicamente (\approx cada 6-8 meses), se introdujeron individuos nuevos de la cepa MF1 para cruzar con la línea *Igf-I*, y así evitar la consanguinidad en la colonia.

Estos ratones fueron suministrados por la empresa Harlan.

1.2.2. Cepa C57Bl/6N

En el resto de colonias de animales transgénicos para evitar consanguinidad, se introdujeron individuos de la cepa C57Bl/6N. Se eligió esta cepa porque no se ha descrito la presencia de mutaciones espontáneas, como si ocurre en la cepa C57Bl/6J que presenta mutaciones en el gen de la α -sinucleína.

Esta línea, además, se utilizó para la realización de algunos experimentos como el cultivo de neuronas de BO e HP E18,5 o, en algunas ocasiones, para la obtención de células madre de BO adulto (CMBOa).

Los ratones fueron enviados por la empresa Harlan.

1.2.3. Cepa CD1

Para la obtención de CMBO embrionario y adulto se utilizaron, de forma habitual, ratones de la cepa CD1.

Para los estudios en etapas embrionarias, se consideró el día de visualización del tapón vaginal como E0,5. La edad embrionaria utilizada para la obtención de CMBO fue E13,5. En el caso de los individuos adultos, se utilizaron ratones de 3-15 meses.

Los ratones fueron mantenidos por el servicio de animalario del Instituto Cajal, CSIC (Madrid).

1.3. Genotipaje

El genotipaje de los ratones se realizó a partir de tejido de cola, procesando en paralelo los animales de la misma camada. Para extraer el ADN (ácido desoxirribonucleico), el tejido se incubó a 55 °C con proteinasa K (600 µg/ml; Roche, 3115879) en 0,5 ml de tampón de lisis Salting Out (Tabla 3) durante toda la noche. Al día siguiente, se añadieron 250 µl de cloruro sódico (NaCl) 5M, se agitó y se dejó reposar 10 min en hielo. Después, se centrifugó la mezcla a 14.000 r.p.m. (revoluciones por minuto) 5 min y se añadió 1 ml de etanol al 96% por cada 500 µl de sobrenadante. Se centrifugó una vez más y se retiró el sobrenadante. Se añadió 1 ml de etanol al 70%, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Por último se dejó secar y se resuspendió el ADN en 50-80 µl de tampón TE (Tris-Base 10 mM, pH=7,5; 1 mM EDTA pH=8) durante toda la noche a 55 °C. La concentración de ADN obtenida fue de 0,1-2 µg/µl.

Tabla 3: Salting Out			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
Tris-HCl, pH 8	40 mM	Roche	03118142001
EDTA	20 mM	Sigma	E5134
SDS	0,5 %	Bio-Rad	161-0418
NaCl	200 mM	Merck	1.06404.1000

El ADN de CMHP, fibroblastos y células de hígado de los ratones Nestina-Cre:*lgf-I* en algunas ocasiones se extrajo de manera similar a lo descrito para colas, y en otros casos se purificó de la interfase obtenida mediante el reactivo TRIzol (ver extracción de ARN).

Tabla 4: Mezcla PCR			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
Agua destilada	-	Gibco	10977-035
Tampón II 10x	1x	Applied Biosystems	N808-0172
MgCl ₂ 25 mM	2 mM	Applied Biosystems	N808-0172
dNTPs 10 mM	0,2 mM	Invitrogen	18427013
Cebadores 10 µM	0,2 µM	Sigma	-
Taq polimerasa	2,5 U	Applied Biosystems	N808-0172

El ADN se amplificó mediante PCR. Para lo cual, por cada muestra se preparó una mezcla de reacción de 48 μ l (Tabla 4) a la que se añadió 2 μ l de ADN. Para la línea ROSA26-YFP, la mezcla de reacción fue igual pero variando la concentración final de cebadores (1 μ M).

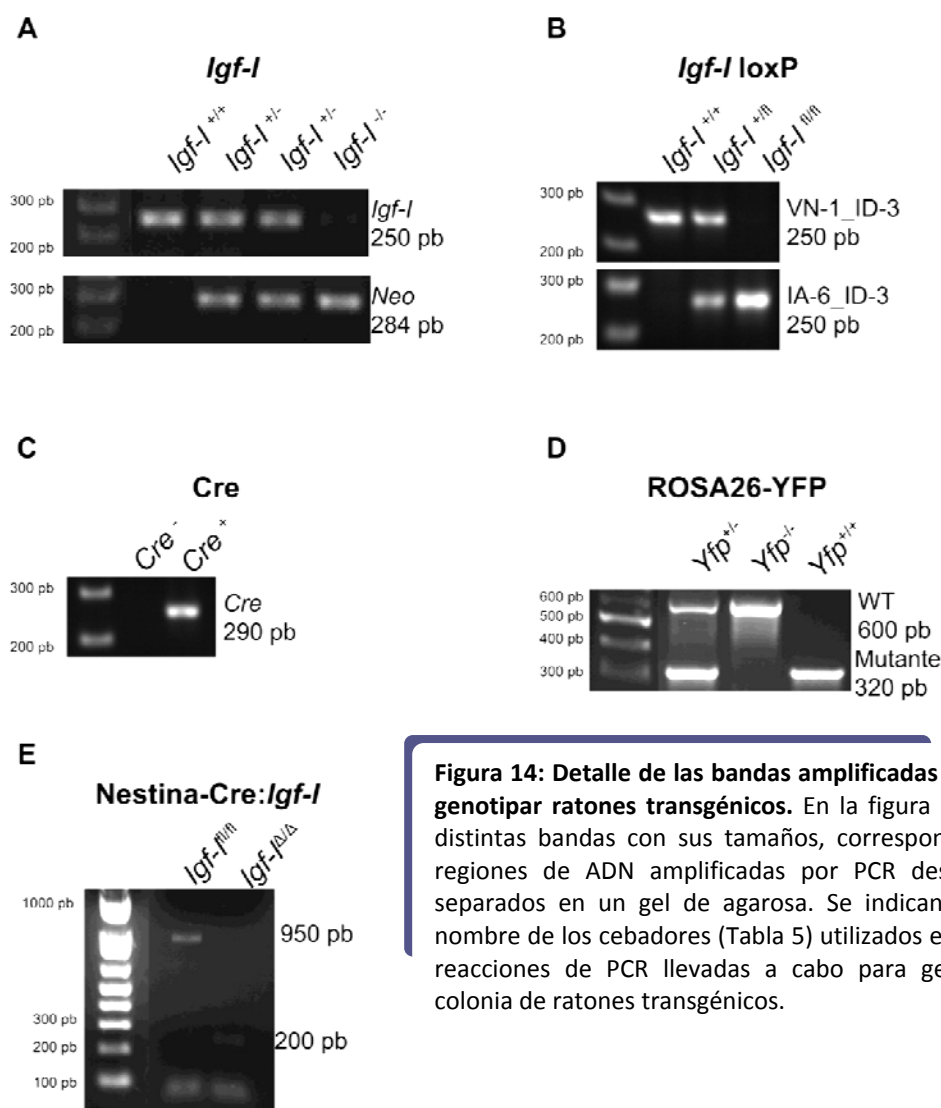


Figura 14: Detalle de las bandas amplificadas por PCR para genotipar ratones transgénicos. En la figura se indican las distintas bandas con sus tamaños, correspondientes a las regiones de ADN amplificadas por PCR después de ser separados en un gel de agarosa. Se indican, también, el nombre de los cebadores (Tabla 5) utilizados en las distintas reacciones de PCR llevadas a cabo para genotipar cada colonia de ratones transgénicos.

Los cebadores utilizados fueron distintos según la línea de ratón a genotipar (Tabla 5). Para cada cebador se comprobó que la secuencia del fragmento amplificado correspondía al gen en cuestión, así como que el tamaño del fragmento era el esperado (Fig. 14)

Además de las muestras a analizar se incluyeron un control negativo (sin ADN) y controles positivos (ADN de ratones con genotipo conocido).

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Thecne, TC-312) y las condiciones empleadas fueron específicas para cada pareja de cebadores (Tabla 6).

Para poder visualizar las bandas de los fragmentos de ADN amplificados, a los 50 μ l mezcla resultante de PCR, se añadieron 10 μ l tampón de carga 6x (Tabla 7) y se resolvieron en un gel de agarosa al 1,2% en tampón TBE (Tris-borato 89 mM, EDTA 2 mM pH 8) con bromuro de etidio (1 μ g/ml, Sigma E1510) o Gel Red (1x, Biotium 41003). Además de las muestras, en uno de los carriles

se cargó 1 µg de marcador de peso molecular de ADN (1Kb+, Invitrogen 10787-018; o 2-log, New England Biolabs N3200S). El gel se dejó correr a 100V durante aproximadamente 30 min en una cubeta de electroforesis (Biorad) y se observaron las bandas en un transiluminador con luz ultravioleta.

Tabla 5: Cebadores utilizados para realizar los genotipajes.

Línea de ratón	Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')
<i>Igf-1</i>	<i>Igf-1</i> sentido	GTCTAACACCAGCCCATTCTGATT
	<i>Igf-1</i> antisentido	GACTCGATTTCACTCCACTCGATCG
	<i>Neo</i> sentido	GCTTGGGTGGAGAGGCTATTC
	<i>Neo</i> antisentido	CAAGGTGAGATGACAGGAGATC
<i>Igf-1</i> loxP	VN-1 sentido	AAGGTGGTAGAAAGCCAGGAC
	IA-6 sentido	AAACCACACTGCTCGACATTG
	ID-3 antisentido	CACTAAGGAGTCTGTATTTGGACC
Nestina-Cre	<i>Cre</i> sentido	TGCCAGGATCAGGGTTAAAG
	<i>Cre</i> antisentido	CGAGTTGATAGCTGGCTGGT
Nestina-Cre: <i>Igf-1</i>	ES-1 sentido	AGCCTCTCAACTAAGACAATA
	ID-3 antisentido	CACTAAGGAGTCTGTATTTGGACC
ROSA26-YFP	<i>Yfp</i> 1 sentido	AAGACCGCGAAGAGTTTGTC
	<i>Yfp</i> 2 sentido	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
	<i>Yfp</i> antisentido	GGAGCGGGAGAAATGGATATG

Tabla 6: Condiciones de la PCR utilizadas para realizar los genotipajes.

Fase	IGF-I	IGF-I loxP	Nestina-Cre	Nestina-Cre: <i>Igf-1</i>	ROSA26-YFP
Desnaturalización inicial	94 °C, 2 min	94 °C, 5 min	94 °C, 5 min	94 °C, 5 min	94 °C, 3 min
Número de ciclos	35	25	35	25	35
Desnaturalización	94 °C, 30 seg	94 °C, 1 min	94 °C, 1 min	94 °C, 1 min	94 °C, 30 seg
Acoplamiento	58 °C, 45 seg	56 °C, 1 min	60 °C, 1 min	56 °C, 1 min	58 °C, 1 min
Elongación	72 °C, 45 seg	72 °C, 1 min	72 °C, 1 min	72 °C, 2 min	72 °C, 1 min
Elongación final	72 °C, 5 min	72 °C, 5 min	72 °C, 5 min	72 °C, 5 min	72 °C, 2 min

Tabla 7: Tampón de Carga 6x

Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
Agua destilada	-	Gibco	10977-035
Azul de Bromofenol	0,25%	Bio-Rad	161-0404
Cianol Xileno	0,25%	Bio-Rad	161-0423
Glicerol	30%	Sigma	G8773

Algunos de los genotipajes fueron realizados en la Unidad de Biología Molecular y Celular del Instituto Cajal, CSIC (Madrid).

2. Estudios en cultivos celulares o *in vitro*

2.1. Disección

Todas las disecciones se realizaron con material autoclavado y en cabina de flujo laminar horizontal.

Para las disecciones de tejido embrionario (E13,5 o E18,5 según el experimento), se sacrificó la ratona mediante dislocación cervical y se limpió con etanol el abdomen, las patas y la cola. Se abrió la cavidad abdominal y se extrajo el útero depositándolo en una placa con Hank's (HBSS, Tabla 8). Se

cortó la pared uterina y la bolsa amniótica que envuelve cada embrión, los cuales se pasaron en otra placa con Hank's. Se cortó la cabeza y, con ayuda de una lupa, se extrajo el cerebro y se transfirió a una nueva placa con Hank's, mantenida en hielo. Posteriormente, se disecaron los BOs o el HP, según el experimento a realizar.

Tabla 8: Hank's			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
HBSS	1x	Gibco	14170-088
HEPES	16,36 mM	Sigma	H4034-100g
NaHCO ₃	10 mM	Sigma	S5761-500mg
Glucosa	10,56 mM	Sigma	G7021-1
Penicilina/Streptomicina	Peni: 50 U/ml Strepto: 50 µl/ml	Gibco	15140-122

En el caso de las disecciones de tejido adulto, se sacrificó la ratona mediante dislocación cervical. Se cortó la cabeza, se extrajo el cerebro y se depositó en una placa con Hank's. En la lupa, se quitaron las meninges y se tomaron los BOs o se disecó el HP.

2.2. Obtención de células madre neurales de BO embrionario

Las células madre embrionarias se obtuvieron a partir del BO de embriones E13,5. Para lo cual, una vez disecado los BOs de toda la camada se incubaron en una placa con Hank's+EDTA (0,02%, Sigma E5134-100g) durante 15 min a 37 °C en un incubador con 5% CO₂. Posteriormente, se pasaron a un tubo falcon de 15 ml y se centrifugó la suspensión celular a 1.000 r.p.m. durante 5 min. Se quitó el sobrenadante, se lavó con Hank's y se volvió a centrifugar. Tras quitar el sobrenadante, se añadieron 200 µl de medio y se realizó una disgregación mecánica suave con una pipeta P200. Seguidamente, se determinó el número de células y su viabilidad mediante el método de exclusión de azul de tripano (*Trypan blue*, Sigma T6146). Finalmente, se sembraron las células a una densidad de 35.000 células/cm² en medio DMEMF12/N2 (Tabla 9) y se añadieron diariamente los factores mitógenos FGF-2 (de las siglas en inglés *Fibroblast Growth Factor-2*, PeproTech 100-18B) y EGF (de las siglas en inglés *Epidermic Growth Factor*, PeproTech AF-100-15) a una concentración de 20 ng/ml (Vicario-Abejón et al. 2003).

Tabla 9: DMEMF12/N2			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
DMEM:F12 (1:1)	1x	Gibco	42400-010
Piruvato	1 mM	Sigma	P2580-25g
NaHCO ₃	22 mM	Sigma	S5761-500mg
Glutamina	4,5 mM	Gibco	25030-024
Penicilina/Streptomicina	Peni: 50 U/ml Strepto: 50 µl/ml	Gibco	15140-122
Apotransferrina	103,2 mg/l	Sigma	T1147-500mg
Putrescina	100 µM	Sigma	P-5780
Progesterona	20 nM	Sigma	P6149-1mg
Selenito Sódico	30 nM	Sigma	S5261-10g
Insulina	10 µg/ml	Sigma	16634-500mg

2.3. Obtención de células madre neurales de BO e HP postnatal y adulto

Las CMN se obtuvieron a partir del BO de ratones adultos de 3-15 meses o de HPs de ratones postnatales de 3 semanas. Para ambos tejidos se utilizó el mismo método, basado en el descrito por (Gritti et al. 1996) con algunas modificaciones (Vergaño-Vera et al. 2009). El tejido de interés se depositó en una placa con Hank's y se troceó con ayuda de unas pinzas de disección o con unas tijeras Castroviejo. Los trozos resultantes se transfirieron a un tubo falcon y se centrifugaron a 1.000 r.p.m. 5 min. Se retiró el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en una solución enzimática (Tabla 10) y se incubó a 37 °C durante 45 min. Transcurrido este tiempo, se inhibió la reacción por dilución con 10 ml DMEMF12/N2 y se centrifugó a 1.000 r.p.m. 5 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en Hank's. Se centrifugó de nuevo y se realizaron sucesivos lavados con Hank's resuspendiendo el sedimento mediante disgregación mecánica. Finalmente, se resuspendieron en medio DMEMF12/N2 suplementado con B27 (1x, Gibco 17504-044) y se sembraron, añadiendo diariamente los factores mitógenos FGF-2 y EGF a una concentración de 20 ng/ml. El material se sembró sin contar en un pocillo de placas multipocillo de 6 por individuo en el caso de animales CD1 o *Igf-I^{+/+}* y en un pocillo de placas multipocillo de 12 por individuo *Igf-I^{-/-}*.

Tabla 10: Solución enzimática			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
Hank's	1x		
EDTA	0,2 mg/ml	Sigma	E5134-100g
Papaína	1 mg/ml	Sigma	3119
Cisteína	0,2 mg/ml	Sigma	C7352-25g

2.4. Mantenimiento de células madre neurales

Las CMN en cultivo en flotación, crecen formando agregados denominados neurosféricas. De manera que cada cierto tiempo es necesario disgregar/pasar esas neurosféricas para permitir que los nutrientes lleguen a todas las células que las componen. Para las de origen embrionario es necesario realizar un pase cada 4 días y para las de adulto cada 7 días.

Para poder disgregar las células, las neurosféricas se incubaron con Hank's+EDTA (previamente atemperado) durante 25 min si son embrionarias o 35 min en el caso de las adultas. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó a 1.000 r.p.m. durante 5 min. Se quitó el sobrenadante y se realizó un lavado con Hank's. Se volvió a centrifugar, se quitó el sobrenadante, se añadieron 200 µl de DMEMF12/N2 y, muy suavemente, se realizó una disgregación mecánica con una pipeta P200. Una vez disgregado el sedimento, se añadieron 800 µl más de medio y se determinó el número de células y su viabilidad con el método de azul de tripano. Finalmente, se sembraron las células a una densidad de 5.000 células/cm² en medio DMEMF12/N2 y se añadieron diariamente los factores mitógenos FGF-2 y EGF.

Para algunos estudios, la adición de factores de crecimiento se realizó diariamente hasta el pase 3, a partir del cual las células se separaron en tres grupos experimentales:

- con adición de factores diariamente (1d).
- con adición de factores cada dos días (2d).
- con adición de factores cada 4 días (4d).

Cuando las CMN fueron obtenidas a partir de animales KO para IGF-I, tanto los cultivos WT como KO se mantuvieron con DMEMF12/N2 con menor concentración de insulina (0,5 µg/ml) para evitar las interacciones cruzadas que pudieran darse entre la insulina y el receptor de IGF-I.

2.5. Cultivos en proliferación de CMN

2.5.1. Cultivos en adhesión

Para poder estudiar la proliferación de las CMN, éstas se sembraron en monocapa sobre cubres de vidrio (Quimigen S.L. 1943-10012). Previamente, los cubres fueron tratados con ácido nítrico (Merck 100456.1000) durante dos noches y posteriormente lavados y autoclavados. Una vez eliminados de impurezas y esterilizados, los cubres se depositaron en pocillos de placas de 24 pocillos y se trataron con poliornitina (15 µg/ml, Sigma P3655-100mg) durante al menos una noche. El día de la siembra, los cubres se lavaron con PBS (Tabla 11) y se incubaron con fibronectina (1µg/ml, Invitrogen 33010-018) durante 4-6 horas a 37 °C.

Tabla 11: PBS			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
NaCl	137mM	Merck	1.06404.1000
KCl	2,7mM	Sigma	P5405-500g
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM	Merck	1.06580.1000
KH ₂ PO ₄	1,7 mM	Merck	1.048773.0250

Las células se sembraron a una densidad de 10.000 células/cm² y se añadieron factores mitógenos, FGF-2 y EGF. Tras cuatro días en cultivo, se dió un pulso de 5-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU; 5 µM, Roche 0280879) de 30 min, 1 hora o 4 horas, según el experimento, para marcar las células proliferativas y se fijaron con paraformaldehído 4% (Panreac 141451.1211) durante 25 min.

El BrdU es un análogo sintético de la timidina que es incorporado por las células durante la fase de síntesis (S) del ciclo celular y puede ser reconocido mediante el uso de anticuerpos específicos.

2.5.2. Cultivos en flotación

Además, se realizaron estudios de proliferación en los que se cultivaron las células como neurosféricas. Las células se sembraron a una densidad de 5.000 células/cm² en placas Petri y se mantuvieron con factores de crecimiento. El día del pase, cuando las neurosféricas alcanzaron confluencia, se dió un pulso de BrdU (5 µM) de 30 min, tras el cual las neurosféricas fueron recogidas en cubres recubiertos con matrigel (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced, BD Biosciences 354230). Para lo cual, los cubres se depositaron en una placa de 24 pocillos, se añadió matrigel (1:100 en medio) y se incubó durante al menos 2 horas a 37 °C. Una vez polimerizado el matrigel, se añadieron 500 µl del medio con las neurosféricas por cubre. Se dejó reposar 10 min a 37 °C y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 25 min.

2.5.3. Análisis clonal

En algunos casos, además de estudiar la proliferación celular, quisimos analizar la autorrenovación de las CMN. Con este objetivo, realizamos un análisis clonal que nos permite estudiar si una única célula es capaz de formar neurosféricas, y por tanto tiene capacidad de

autorrenovación (Vicario-Abejón et al. 2003; Román-Trufero et al. 2009; Mendez-Gomez y Vicario-Abejón 2012).

Para realizar el estudio, sembramos 2 células/pocillo en placas de 96 pocillos. En cada pocillo se añadieron 200 µl de DMEMF12/N2 con medio condicionado (1:1) y factores mitógenos. Se usó como medio condicionado, DMEMF12/N2 en el que habían crecido en pases anteriores las mismas células que íbamos a sembrar. Al día siguiente, se comprobó en un microscopio invertido aquellos pocillos en los que sólo había una célula y se marcaron. Los clones se mantuvieron en cultivos durante 14 días y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 25 min. Se calculó el porcentaje de clones que se mantuvieron en cultivo y se clasificaron en función del número de células resultantes (1, 2, 4-8 o más de 8 células). Además, se calculó el tamaño de las neuroesferas que tenían más de 8 células.

2.6. Cultivos en diferenciación de CMN

2.6.1. Diferenciación a corto plazo

Para algunos estudios, quisimos comprobar la multipotencialidad (diferenciación a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos) que tenían las CMN en cultivos poblacionales. Para lo cual, una vez disgregadas las neuroesferas, las células se sembraron en cubres tratados con poliornitina y fibronectina (como se describe en el apartado 2.5.1 de Material y Métodos) a una densidad de 100.000 células/cm² en medio DMEMF12/N2 en ausencia de FGF-2 y EGF. Estos cultivos se mantuvieron durante 3 días y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 25 min.

2.6.2. Diferenciación a largo plazo

En otros estudios, quisimos analizar el porcentaje de neuronas de distintos tipos que se obtenían a partir de CMBOe, así como su morfología y su sinaptogénesis. Con este fin, una vez disgregadas las neuroesferas, las células se sembraron en cubres tratados con poliornitina y fibronectina a una densidad de 125.000 células/cm² en medio DMEMF12/B27 (Tabla 12) + 5% FBS en ausencia de factores de crecimiento. Se añadió al medio el suplemento B27 y suero para favorecer la supervivencia y maduración neuronal. A los 6 días, se realizó un cambio parcial de medio (300 µl) por DMEM/B27 (Tabla 13) + 5% FBS. Estos cultivos se mantuvieron durante 14 ó 21 días y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 25 min.

Tabla 12: DMEMF12/B27			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
DMEM:F12 (1:1)	1x	Gibco	42400-010
Piruvato	1 mM	Sigma	P2580-25g
NaHCO ₃	22 mM	Sigma	S5761-500mg
Glutamina	4,5 mM	Gibco	25030-024
Penicilina/Streptomcina	Peni: 50 U/ml Strepto: 50 µl/ml	Gibco	15140-122
B27	1x	Gibco	17504-044

En algunos pocillos, se añadió BDNF (de las siglas en inglés, *Brain Derived Neurotrophic Factor*, Peprotech 450-02) o NT-3 (del inglés *Neurotrophin-3*, R&D Systems 267-N3) a una concentración de 20 ng/ml cada 3 días (Vicario-Abejón et al. 1998; Vergaño-Vera et al. 2006).

Tabla 13: DMEM/B27			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
DMEM	1x	Gibco	41966
HEPES	16,7 mM	Sigma	H4034-100g
Penicilina/Streptomycin	Peni: 50 U/ml Strepto: 50 µl/ml	Gibco	15140-122
B27	1x	Gibco	17504-044

2.7. Cultivo de neuronas

Los cultivos de neuronas se obtuvieron a partir del BO y del HP de embriones E18,5. El tejido se disecó como se describe en el apartado 2.1. Una vez obtenido los tejidos, se depositó en una placa que contenía Hank's y se troceó con ayuda de unas tijeras Castroviejo. Posteriormente, se transfirió a un tubo falcon de 15 ml para poder centrifugarlo a 1.000 r.p.m. durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y se incubó en agitación con 2,5 ml de solución de tripsinización (Tabla 14) a 37 °C durante 5 min. Se inhibió la reacción con 10 ml de DMEMF12/N2 + 10% FBS y se volvió a centrifugar. Seguidamente, se retiró el sobrenadante y se añadió al sedimento 1,5 ml de solución de trituración (Tabla 15), disgregándolo muy despacio con una pipeta P1000. Cuando no se observaron restos de tejido, se añadió Hank's y se centrifugó a 1.000 r.p.m. durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 500 µl de DMEMF12/N2. A continuación, se determinó el número de células y su viabilidad mediante el método de exclusión de azul de tripano. Finalmente, se sembraron las células a una densidad de 125.000 células/cm² en medio DMEMF12/N2 + 5% FBS en cubres tratados con poliornitina y fibronectina como se ha descrito previamente.

Tabla 14: Solución de tripsinización			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
Hank's	-	-	-
Tripsina	0,1%	Worthington	57H9722
DNasa	0,4%	Worthington	S7C9551A

Tabla 15: Solución de trituración			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
Hank's	-	-	-
DNasa	1%	Worthington	S7C9551A

A los 6 días en cultivos, se realizó un cambio parcial de medio (300 µl) por DMEM/N2 (Tabla 16) + 5% FBS.

Tabla 16: DMEM/N2			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
DMEM	1x	Gibco	41966
HEPES	16,36 mM	Sigma	H4034-100g
Penicilina/Streptomycin	Peni: 50 U/ml Strepto: 50 µl/ml	Gibco	15140-122
Apotransferrina	103,2 mg/l	Sigma	T1147-500mg
Putrescina	100 µM	Sigma	P-5780
Progesterona	20 nM	Sigma	P6149-1mg
Selenito Sódico	30 nM	Sigma	S5261-10g
Insulina	10 µg/ml	Sigma	16634-500mg

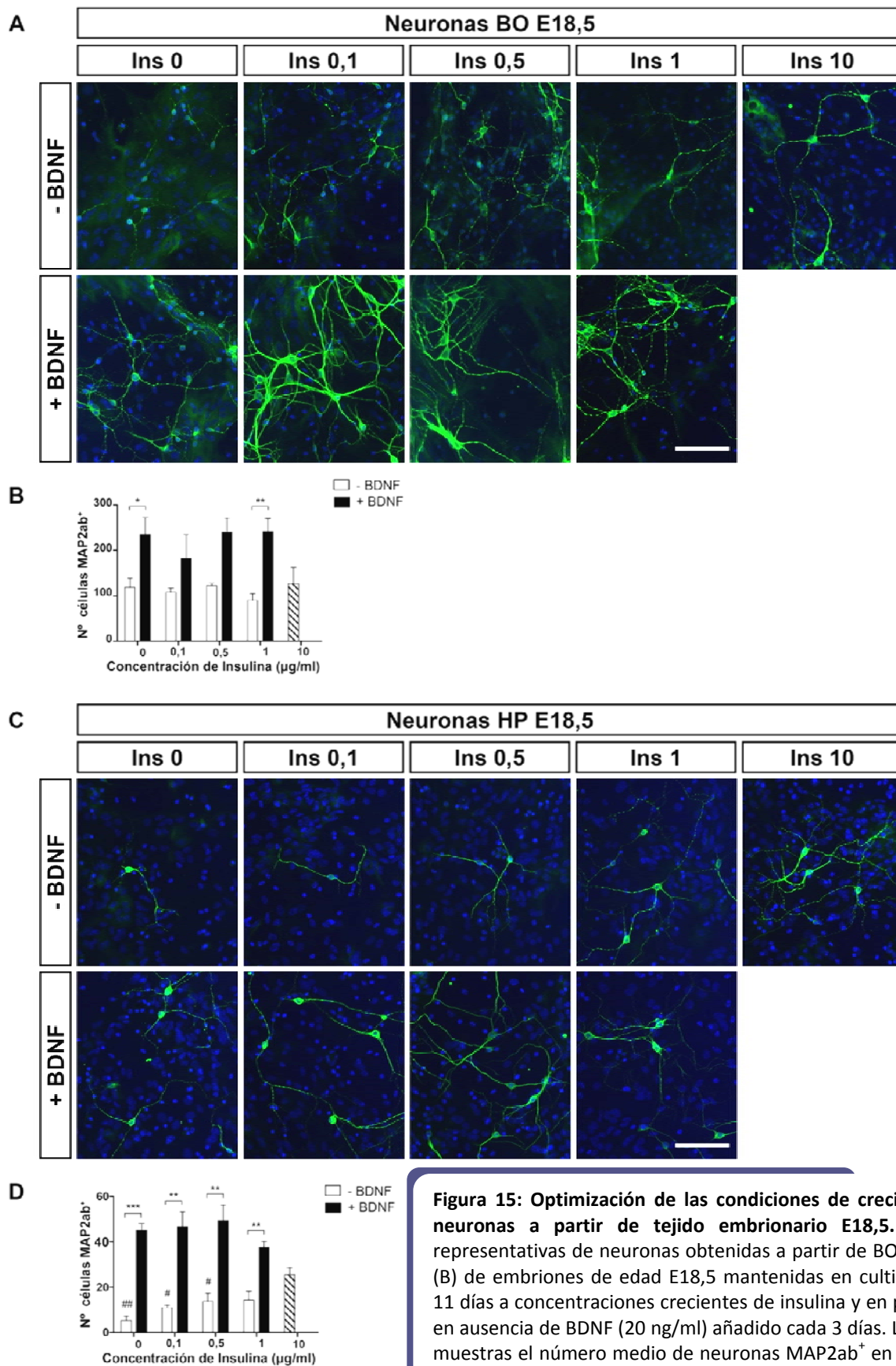


Figura 15: Optimización de las condiciones de crecimiento de neuronas a partir de tejido embrionario E18,5. Imágenes representativas de neuronas obtenidas a partir de BOs (A) e HPs (B) de embriones de edad E18,5 mantenidas en cultivo durante 11 días a concentraciones crecientes de insulina y en presencia o en ausencia de BDNF (20 ng/ml) añadido cada 3 días. Los gráficos muestran el número medio de neuronas MAP2ab⁺ en 10 campos para cada condición. Los resultados son la media \pm SEM de 3-4 cultivos. Los * muestran el resultado del análisis estadístico por *t* de Student de los valores de una determinada concentración de insulina con BDNF comparado con la misma concentración sin BDNF (**P* < 0,05; ***P* < 0,01; ****P* < 0,001). Las # muestran el resultado del análisis estadístico por *t* de Student de los valores de una determinada concentración de insulina comparados con la concentración de insulina control, 10 µg/ml (#*P* < 0,05; ##*P* < 0,01). Barra de escala = 90,4 µm.

Tras 14 días en cultivo, las células se fijaron con paraformaldéhidio al 4% durante 25 min.

En algunos experimentos, se prepararon cultivos neuronales obtenidos de embriones individuales WT y KO para *Igf-I*. Para lo cual, cada embrión se procesó por separado como sigue. Cada tejido se depositó en un tubo falcon de 15 ml que contenía 2 ml de Hank's+EDTA y se incubó 15 min a 37 °C. Posteriormente, se añadió Hank's para diluir el EDTA y se centrifugó a 1.000 r.p.m. durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y se disgregó muy despacio el tejido en 400 µl de medio con ayuda de una P1000. Seguidamente, se determinó el número de células y su viabilidad mediante el método de exclusión de azul de tripano. Por último, se sembraron las células a una densidad de 35.000-40.000 células/cm² para las células de BO y a 70.000-75.000 células/cm² las de HP en medio DMEMF12/N2 (sin insulina) + 5% FBS. En este caso, se eliminó la insulina del medio para evitar las interacciones cruzadas que pudieran darse entre el receptor de IGF-I y la insulina. Además, a los cultivos de HP se les añadió BDNF a una concentración de 20 ng/ml cada 3 días, porque en ausencia de insulina la supervivencia neuronal era muy baja (ver gráfica en Fig. 15).

A los 6 días en cultivos, se realizó un cambio parcial de medio (300 µl) por DMEM/N2 (sin insulina) + 5% FBS.

Pasados 14 días en cultivo, las células fueron fijadas con paraformaldehido al 4% durante 25 min.

2.8. Inmunocitoquímica

Tras su fijación, todos los cultivos fueron conservados a 4 °C en azida sódica (0,02% en PBS, Sigma S8032-25GR) hasta su uso para evitar contaminaciones.

Antes de realizar las tinciones sobre los cubresobjetos, estos fueron lavados tres veces con PBS para eliminar los restos de azida. Posteriormente, las células se incubaron con la solución de permeabilización y bloqueo (Tabla 17) durante una hora a temperatura ambiente. Después, se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla 18) durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 3 min y se les añadió el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con una molécula fluorescente (Tabla 19). Finalmente, se lavaron las células con PBS y se montaron con Mowiol (Calbiochem 475904).

Tabla 17: Solución de permeabilización y bloqueo para cultivos			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
Tritón X-100	0,1%	Sigma-Aldrich	T-8787-100ml
NGS	10%	Millipore	S26-100ml
PBS	1x	-	-

Para inmunoteñir las neurosféricas, se permeabilizaron con tritón al 0,3% durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos primarios durante 2 noches a 4 °C. Pasado ese tiempo, se lavaron tres veces y se expusieron a los anticuerpos secundarios durante 4 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron con PBS y se montaron con Mowiol para su conservación.

En algunos casos, en el penúltimo lavado de la inmunocitoquímica se añadió DAPI (1µg/ml, Sigma D9542-1mg) o Hoestch (1µg/ml, Sigma 861405-100mg) para poder visualizar los núcleos de las células.

En todos los casos, se realizaron controles para comprobar la especificidad de los anticuerpos primarios y secundarios.

Tabla 18: Anticuerpos primarios usados en inmunocitoquímica

Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial	Nº Catálogo
BrdU	Ratón	1:250	BD	347580
GABA	Conejo	1:2000	Sigma	A2052
GFAP	Conejo	1:1000	DakoCytomation	Z 0335
GFAP	Ratón	1:1000	Chemicon	MAB360
IGF-I	Conejo	1:40	IBT	PABCa
IGF-IR	Conejo	1:50	Cell Signaling Technology, Inc.	3027
Ki67	Conejo	1:1000	Thermo Fisher Scientific Inc.	RM-9106 - S0
MAP2ab	Ratón	1:250	Sigma-Aldrich	M1406
Nestina	Ratón	1:50	Millipore	MAB353
O4	Ratón	1:150	Millipore	MAB345
Sinapsina I	Conejo	1:500	Millipore	AB1543
Sinaptofisina	Conejo	1:4	ZYMED Laboratories	18-0130
Sox2	Ratón	1:50	R&D Systems	MAB2018
Tbr1	Conejo	1:2000	Millipore	AB9616
Tbr2	Conejo	1:1000	Millipore	AB9618
TH	Conejo	1:100	Millipore	AB152
TrkB	Conejo	1:50	Santa Cruz Biotechnology	cs-12-G
TrkC	Conejo	1:50	Santa Cruz Biotechnology	sc-117
TuJ1	Conejo	1:2000	Covance	PRB-435P
vGlut1	Cobaya	1:2500	Millipore	AB5905

Tabla 19: Anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Reconoce	Especie	Dilución	Casa comercial	Nº Catálogo
Alexa Fluor 488 anticonejo	IgG	Burro	1:500	Molecular Probes	A11008
Alexa Fluor 488 antiratón	IgG	Burro	1:500	Molecular Probes	A21203
Alexa Fluor 488 antirata	IgG	Burro	1:500	Invitrogen	A21208
Alexa Fluor 594 anticonejo	IgG	Burro	1:500	Molecular Probes	A11012
Alexa Fluor 594 antiratón	IgG	Burro	1:500	Molecular Probes	A21202
TexasRed anticobaya	IgG	Cabra	1:500	Vector Laboratories	TI-7000
FITC antiratón	IgM	Cabra	1:500	Jackson ImmunoResearch	115-095-075

2.9. Estudios de proliferación y ciclo celular

Para estudiar la proliferación y el ciclo celular de las células se utilizaron dos aproximaciones:

1. Análisis de la incorporación de BrdU en células proliferativas.

Para visualizar el BrdU, previamente al protocolo descrito para inmunotinciones, las células se permeabilizaron con tritón al 0,4% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron con PBS y se trataron con ácido clorhídrico (2N, Merck 1.00319.1011) 10 min a temperatura ambiente o 15 min a 37 °C si eran neuroesferas. Se neutralizó la reacción del ácido con borato sódico (0,1M pH=9,5, Merck 1.06309.0025) durante 10 min.

2. Marcaje con yoduro de propidio

Para analizar la proporción de células que se encuentran en las distintas fases del ciclo, las células fueron teñidas con yoduro de propidio (IP). Para lo cual, una vez disgregadas y lavadas con PBS, se fijaron con etanol al 70% durante una noche. Se lavaron, se resuspendieron a una concentración de 10^6 células/ml y se incubaron con ribonucleasa A ($10\text{U}/\mu\text{l}$, Sigma R5503-100mg) durante 20 min a 37°C . Finalmente, se añadió IP ($25\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma P4170) y se analizó por citometría de flujo (FACS-Aria).

En células permeabilizadas, el IP se une al ADN, permitiendo dividir las células en grupos en función de su cantidad de ADN:

- las células que estén en las primeras fases del ciclo celular o estén en parada (G_0/G_1) tendrán una cantidad de ADN, x .
- las células que estén duplicando su ADN (S) tendrán una cantidad intermedia de ADN ($x-2x$).
- las células que ya hayan terminado de duplicar su ADN y estén empezando a dividirse tendrán el doble de material genético, $2x$ (G_2/M).

2.10. Estudios de muerte celular

Para analizar la muerte celular en las células en cultivos se utilizaron dos métodos:

1. Técnica de TUNEL

Para detectar células apoptóticas en cultivos adherentes, se utilizó un kit comercial (TdT-mediated dUTP Nick end labelling; In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red, Roche 12 156 792 910) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se permeabilizaron con BGT (Tabla 20) 2 veces durante 15 min. Posteriormente, fueron incubadas 1 hora a 37°C con la mezcla de reacción que contiene la enzima transferasa terminal y los oligonucleótidos (dNTPs) unidos a un fluorocromo en una relación 1:10. Después, se realizaron tres lavados con PBS y se montaron con Mowiol. Paralelamente, se realizaron controles positivos, cubres incubados previamente con 5 unidades de DNasa (Invitrogen A34850) durante 15 minutos; y negativos, mezcla de los dNTPs sin enzima.

Tabla 20: Solución de permeabilización y bloqueo BGT			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
BSA	3 mg/ml	Sigma	A7030-10g
Glicina	100 mM	Merck	5.0019.1000
Tritón X-100	0,25%	Sigma-Aldrich	T-8787-100ml
Agua miliQ		-	-

Esta técnica permite marcar los extremos del ADN, de manera que se pueden visualizar los fragmentos de ADN que se producen durante la apoptosis.

2. Marcaje con anexina y yoduro de propidio

Para estudiar la muerte celular en células cultivadas en flotación, se utilizó un kit para detección de apoptosis (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD 556547).

Las neurosféricas fueron disgregadas suavemente, lavadas con PBS y resuspendidas a una concentración de 10^6 células/ml en tampón específico que favorece la unión de la anexina

(HEPES/NaOH 0,1 M pH 7.4, NaCl 1,4 M, CaCl₂ 25 mM). Se añadieron 5 µl de Anexina V conjugada al fluorocromo FITC a 100 µl de la suspensión celular y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Se añadió ioduro de propidio (2,5 µg/ml). Finalmente, se añadieron 400 µl de tampón y se analizó por citometría de flujo (FACS-Aria). En paralelo, se analizaron como controles, células sin marcar y células marcadas con los dos marcajes por separado.

Cuando inician la apoptosis, las células traslocan a la cara externa de la membrana plasmática el lípido fosfatidilserina, que es reconocido por la anexina (anexina⁺, IP⁻). En fases más avanzadas de la apoptosis, las células pierden la integridad de la membrana e incorporarían IP (anexina⁺, IP⁺). Las células muertas, también incorporan de IP pero no serían reconocidas por la anexina (anexina⁻ IP⁺). Las células vivas no estarían marcadas por ninguno de los marcajes (anexina⁻ IP⁻) (Fig. 16).

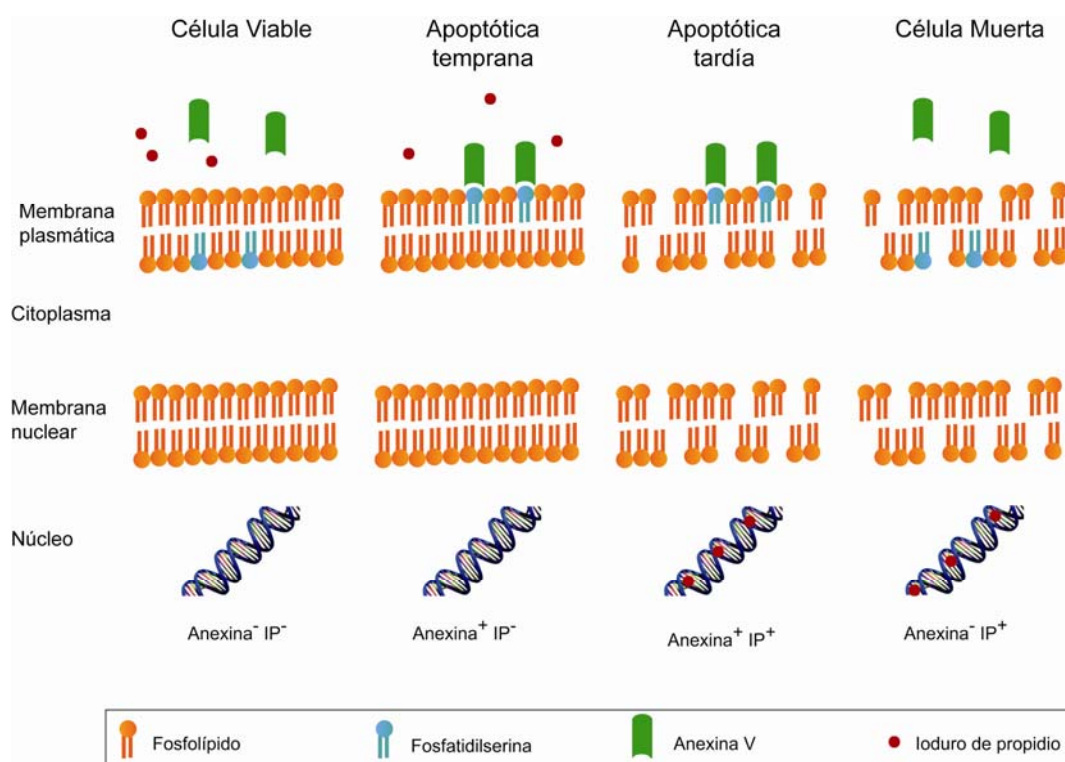


Figura 16: Esquema de las fases de muerte celular. En el dibujo se ilustran las características de las células según la fase de la muerte celular en la que se encuentran. Las células viables conservan la integridad de la membrana plasmática (son Anexina⁻ IP⁻). En las células apoptóticas tempranas se transloca la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana, de manera que puede ser reconocida por la anexina (Anexina⁺ IP⁻). En fases más tardías, las membranas pierden su integridad de manera que el IP puede unirse al ADN (Anexina⁺ IP⁺). En células muertas, la integridad de las membranas se pierde y no se transloca la fosfatidilserina (Anexina⁻ IP⁺).

2.11. Contajes celulares

En la mayoría de los estudios se determinó el porcentaje de células marcadas con un determinado anticuerpo. Para lo cual, en cada muestra, se realizaron contajes del número de células positivas en diez campos aleatorios a un objetivo de 40x en un microscopio de fluorescencia y se calculó el porcentaje de células con respecto al total de la población (DAPI o Hoestch). El resultado se

expresó como la media \pm SEM (de las siglas en inglés *standard error of the mean*) de células en diez campos de 4-20 muestras de 2-6 experimentos independientes.

En el caso de las neurosféricas, para determinar el porcentaje de células positivas para un marcador, se analizaron imágenes de planos ópticos obtenidos con un microscopio de fluorescencia confocal. Previamente, se determinó que las células están homogéneamente distribuidas en toda la neurosfera, ya que no se encontraron diferencias significativas ($<1,8\%$) en el número de células entre planos de la misma neurosféricas. Además, se determinó el volumen de las neurosféricas con ayuda del programa ImageJ (NIH) a partir de imágenes de microscopio confocal tomadas cada $3\ \mu\text{m}$ a lo largo de todo el grosor de la neurosféricas. El resultado se expresó como la media \pm SEM 15-30 neurosféricas de 2-4 experimentos independientes.

En los cultivos de diferenciación a largo plazo o en los cultivos de neuronas, además de estudiar las poblaciones celulares, se analizó la morfología de las neuronas (número de neuritas primarias/secundarias, la longitud total de las neuritas y el perímetro celular) utilizando el programa ImageJ. En algunos casos, además, se determinó el número total de botones sinápticos y su tamaño a partir de imágenes adquiridas a 63x y con 3,5 de zoom digital en un microscopio confocal. Para medir el tamaño de los botones sinápticos se utilizó la herramienta de análisis de partículas del programa ImageJ y se calculó el tamaño medio de los botones por neurona. El resultado se expresó como la media \pm SEM de células o botones de 3-4 muestras de 2-4 experimentos independientes.

2.12. Cultivo de fibroblastos

Los fibroblastos se aislaron a partir de fragmentos de aproximadamente 1cm^2 de piel de la región pectoral de los ratones *Igf-1^{fl/fl}* e *Igf-1^{Δ/Δ}* de 2-3 meses de edad.

Tabla 21: Solución enzimática para fibroblastos			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
Medio RPMI	-	Invitrogen	A1049101
Colagenasa	2,75 mg/ml	Sigma-Aldrich	C0130
Hialuronidasa	1,25mg/ml	Sigma-Aldrich	H3884
DNasa	0,1 mg/ml	Labclinic	DPLS002139
Peni./Estrept.	0,5%	Gibco	15140-122
Anfotericina	0,25 ug/ml	Invitrogen	15290-015

Previamente, se eliminó el pelo de la zona y se limpió con etanol. El fragmento de piel se depositó en una placa con Hank's y, bajo una lupa, se eliminó el exceso de grasa. Posteriormente, se transfirió la porción de piel a una placa con solución de tripsinización (0,5% tripsina, 4,8mM EDTA en Hank's) y se incubó toda la noche a $4\ ^\circ\text{C}$. Al día siguiente, se bloqueó la tripsina en DMEM con 10% de FBS y se separó la epidermis de la dermis. A continuación, se cortó la dermis en pequeños trozos que se incubaron en solución enzimática (Tabla 21) 30 min a temperatura ambiente y se disgregaron mecánicamente con una pipeta. Seguidamente, se centrifugó el tejido a 1500 r.p.m. durante 10 min y el sedimento se resuspendió en DMEM/10% FBS. Finalmente, después de comprobar la viabilidad celular mediante el método de azul de tripano, las células se sembraron a una densidad de $20.000\ \text{células}/\text{cm}^2$ en placas recubiertas con gelatina al 0,1%. A los 3-4 días, las células alcanzaron confluencia y fue necesario pasarlas, para lo cual se separaron con tripsina y se sembraron en una

placa nueva a la misma densidad. Después de varios pases, las células se recogieron en TRIzol para extraer ARN y ADN.

2.13. Cultivo de células de hígado

Las células del hígado se aislaron a partir de los ratones *Igf-I^{fl/fl}* e *Igf-I^{Δ/Δ}* de 2-3 meses de edad.

En primer lugar, se perfundió el hígado a través de la vena cava con tampón de perfusión (HBSS; EDTA 0,5 mM; HEPES 25 mM) y, seguidamente, con colagenasa al 0,02%. Se depositó el hígado en una placa con Hank's, se troceó y se filtró con una gasa para eliminar restos de tejido sin digerir. A continuación, se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 5 min y se resuspendió el sedimento en medio (Tabla 22). Después, se separaron las células muertas con una solución isotónica Percoll (Sigma P4937) y las vivas se lavaron con medio. Se centrifugó a 500 r.p.m. durante 5 min, se determinó el número de células mediante el método de exclusión de azul de tripano y se sembraron a una densidad de 10.000 células/cm² en medio con 10% FBS. Al día siguiente, se retiró el medio y se añadió medio sin suero. Pasados 10 días en cultivo, las células se recogieron en TRIzol para extraer ARN y ADN.

Tabla 22: Medio para hepatocitos

Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
Williams's Medium	-	Invitrogen	E 12551-032
Glutamina	2 mM	Gibco	25030-024
Penicilina/Streptomicina	Peni: 50 U/ml Strepto: 50 µl/ml	Gibco	15140-122
Insulina	10 nM	Sigma	16634-500mg

3. Estudios *in vivo*

3.1. Marcaje de células proliferativas *in vivo*

3.1.1. Producción de partículas retrovirales

Para marcar células proliferativas, se utiliza un vector retroviral que es capaz de infectar las células que estén en división e introducir en su ADN genómico el genoma viral. De esta manera, podemos insertar un gen cuya expresión permita visualizar posteriormente la célula como el gen de la GFP (Fig. 17 A).

Para producir las partículas virales, se utilizó la línea celular 1F8, una línea monoclonal derivada, a su vez, de la línea celular 293GPG (Ory et al. 1996; Heinrich et al. 2011).

Tabla 23: DMEM/F12 para 1F8

Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
DMEM/F12	1x	Gibco	21331
Glutamina	1x	Gibco	25030-024
Puromicina	2 µg/ml	Calbiochen	540411
Tetraciclina	2 µg/ml	Sigma	T-7660
G148	0,3 mg/ml	Calbiochen	345810
FBS	10%	Sigma	F2442

Estas células expresan constitutivamente los genes *Gag* y *Pol*, proteínas de la cápside y de la maquinaria viral del MLV (de las siglas en inglés *murine leukemia viruses*). Además, contienen los

genes *VSVG*, proteínas de la envuelta, bajo un control *Tet-off*, de manera que su expresión se induce rápidamente con la retirada del medio de la tetraciclina.

El medio de mantenimiento de las células 1F8 usado fue DMEM/F12 con antibióticos (Tabla 23). Cuando alcanzaron el 70-80% de confluencia, se lavaron con PBS, se añadió tripsina/EDTA (0,25%, Gibco 25300-054) y se incubó unos minutos a temperatura ambiente. Cuando las células se despegaron de la placa, se disgregaron con una pipeta y se añadió medio para parar la reacción de tripsinización. Finalmente, se sembraron en medio a una dilución 1:5.

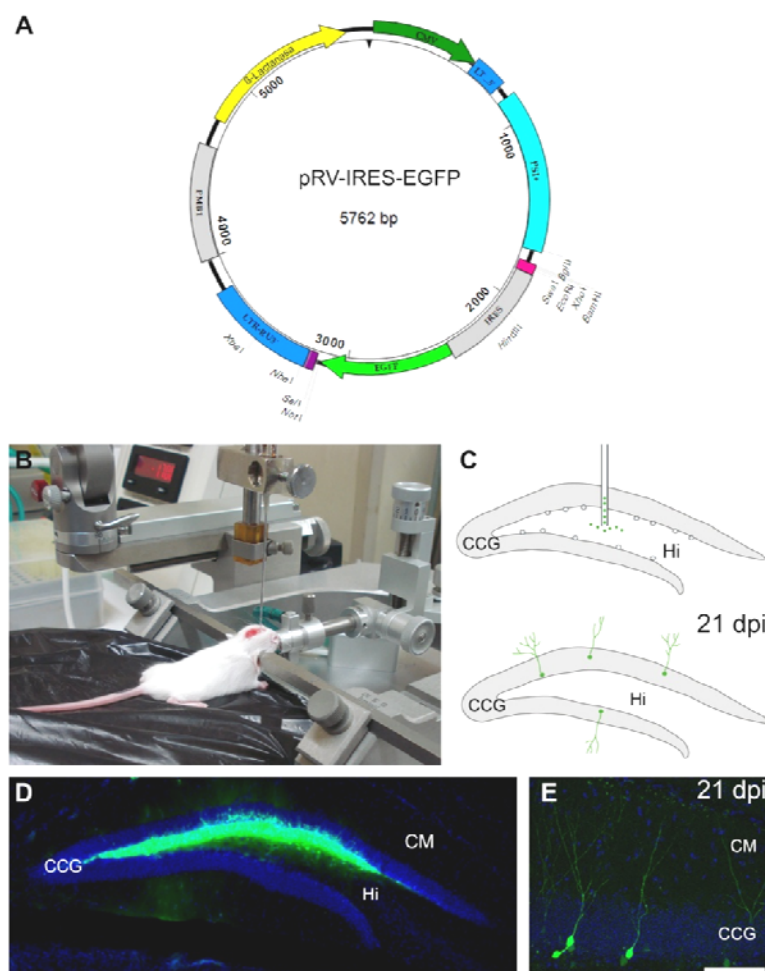


Figura 17: Inyección estereotóxica de partículas retrovirales en el giro dentado de ratón postnatal. (A) Esquema del vector retroviral utilizado para transducir el gen *egfp* en las células proliferativas. **(B)** Las inyecciones fueron realizadas en ratones postnatales (P21) colocados un aparato estereotáxico digital, con un capilar acoplado a una jeringa Hamilton. **(C)** La inyección se realizó en la zona del hilus del giro dentado del hipocampo para que las partículas retrovirales pudieran difundir e infectar las células en división, las cuales se localizan en la zona subgranular. Las células infectadas expresarán la proteína EGFP y tras 21 días postinyección (dpi) podrá ser analizada su migración, diferenciación y maduración en la CCG del GD. **(D)** Comprobación de las coordenadas mediante la inyección de células GFP⁺. Al día siguiente de la inyección, el animal fue anestesiado, el tejido fue cortado y las secciones fueron observadas en un microscopio de fluorescencia. **(E)** Ejemplo de algunas neuronas infectadas con partículas

Para producir las partículas virales, las células se sembraron en medio con una menor concentración de tetraciclina un día antes, para inducir la expresión progresiva de las proteínas *VSVG* (Tabla 24). El día de la transfección, se prepararon en un tubo 150 µg plásmido retroviral en medio OPTIMEM (Gibco 51985) y en otro lipofectamina (Invitrogen 11668-019) en OPTIMEM (1:25) y se dejó reposar 10 min. A continuación, se mezcló el contenido de los dos tubos y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Se cambió el medio a las células por el medio de transfección (OPTIMEM + 10% FBS) y pasados los 30 min se añadió la mezcla con el plásmido sobre las células. Al

día siguiente, se cambió el medio a las células por el medio de empaquetamiento (Tabla 25). Los días 3, 5 y 7 siguientes, se recogieron los sobrenadantes conteniendo las partículas virales.

Tabla 24: DMEM/F12 bajo en tetraciclina			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
DMEM/F12	1x	Gibco	21331
Glutamina	1x	Gibco	25030-024
Tetraciclina	0,5 µg/ml	Sigma	T-7660
FBS	10%	Sigma	F2442

Tabla 25: Medio de empaquetamiento			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
DMEM	1x	Gibco	11960
Glutamina	1x	Gibco	25030-024
NEAA*	0,1 mM	Invitrogen	11140-035
Piruvato	0,5 µg/ml	Sigma	P-5280
FBS	10%	Sigma	F2442
*NEAA= aminoácidos no esenciales (<i>Non-Essential Amino Acids</i>)			

Después, las partículas retrovirales fueron concentradas. Primero, se centrifugó el sobrenadante a 3.500 r.p.m. durante 15 min y se filtró con membranas de PVDF de 0,45 µm (Millipore). A continuación, se centrifugó en una ultracentrífuga con rotor SW28 a 22.000 r.p.m. durante 2 horas a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en TBS-5 (Tabla 26). Después, se centrifugó en una ultracentrífuga con rotor SW60 a 22.000 r.p.m. durante 2 horas a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en TBS-5. Finalmente, se hicieron alícuotas y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

Tabla 26: Tampón TBS-5			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
Agua miliQ			
Tris-Base	1 M	Roche	03573826001
NaCl	5 M	Merck	1.06404.1000
KCl	1 M	Sigma	P5405-500g
MgCl ₂	1 M	Sigma	M1028

Para titular las partículas virales, se utilizó las células 293T. Para lo cual, se sembraron 100.000 células y se añadieron sucesivas diluciones seriadas de la alícuota viral. A los 3 días, se fijaron con PFA y se contó el número de colonias verdes formadas. Los títulos obtenidos fueron de 10¹³.

3.1.2. Inyección de partículas retrovirales

Para marcar las células proliferativas del GD del HP y poder estudiar su diferenciación, migración y maduración *in vivo*, se inyectaron partículas virales preparadas por empaquetamiento de vectores retrovirales mediante estereotaxia (Fig. 17 B).

La edad elegida para realizar las inyecciones fue P21 (21 días de desarrollo postnatal, momento de neurogénesis muy activa) y se analizaron 21 días postinyección (dpi), tiempo que dura la maduración morfológica de las células grano del GD *in vivo* (Fig. 17 C) (Zhao et al. 2006).

Tabla 27: Coordenadas P21 MF1		
Coordenada	WT	KO
Anteroposterior	-(d + 0,2)	-(d + 0,1)
Lateral	1,9	1,2
Dorsoventral	-2	-1,6
d= ½ distancia entre bregma y lambda		

En primer lugar, se determinaron las coordenadas (tomando como punto de referencia bregma, coordenada 0) para que la inyección quedara en el hilus del GD de ratones WT y KO para *Igf-1* de la cepa MF1 (Tabla 27).

Durante todo el transcurso de la cirugía, los animales se mantuvieron anestesiados con anestesia inhalatoria (Isoflurano, IsoFlu; Esteve 571329.8) con un flujo de oxígeno de 0,8-1 l/min. Una vez dormido el ratón, se colocó en la camilla acoplada al aparato estereotáxico y se expuso el cráneo realizando una incisión en la piel. Con ayuda de una lupa, se localizaron los puntos de referencia bregma y lambda y se comprobó que el cráneo estuviera colocado completamente horizontal. Posteriormente, tomando como punto 0 bregma, se perforó el cráneo en las coordenadas, previamente determinadas para el GD, con ayuda de un microtaladro. Seguidamente, se rompió la meninge con unas pinzas finas de disecciones y se inyectaron 2 µl de partículas retrovirales. Para la inyección de partículas retrovirales, se utilizó una jeringa Hamilton a la que se acopló un capilar muy fino (50-100 µm) para evitar al máximo el daño tisular. Finalmente, tras esperar 10 min para evitar reflujo, se retiró la jeringa y se cosió la piel con hilo de sutura.

Los animales inyectados, después de la cirugía, se mantuvieron en el animalario en condiciones normales y tras 21 dpi, se perfundieron para poder ser analizados.

3.2. Perfusión de los animales

Los animales, independientemente de que hayan sido inyectados con partículas retrovirales o no, fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina (100 mg/kg, Imalgène 500) y xilacina (10 mg/kg, Rompun 2%). Transcurridos 5-10 min, se comprobó que los animales estuvieran correctamente anestesiados, verificando la ausencia de reflejo podal.

Los individuos adultos, se colocaron en un corcho sujetos por las extremidades delanteras y se realizó una incisión en el abdomen a la altura de la apófisis xifoides para abrir la caja torácica. Una vez expuesto el corazón, se pinzó el abdomen para favorecer el flujo hacia la parte superior del cuerpo, se realizó un corte en la aurícula derecha y se perfundieron 20 ml de cloruro sódico (NaCl, 0,9%) y 20 ml de PFA al 4% a través del ventrículo izquierdo. Posteriormente, se cortó la cabeza y se retiró la piel y la parte dorsal del cráneo.

Algunos animales fueron inyectados con una dosis de BrdU (100 µg/g) dos horas antes de la perfusión para marcar las células proliferativas.

Para la obtención del cerebro embrionario, la hembra gestante se anestesió mediante inyección intraperitoneal y los embriones se procesaron individualmente. Para ello, se extrajo un solo embrión, manteniendo al resto en el interior del útero, se puso en hielo y se perfundió a través del ventrículo izquierdo de manera similar a lo descrito para adultos. Posteriormente, se cortó la cabeza y se retiró la piel. Este proceso se repitió para cada embrión hasta completar la camada.

3.2.1. Procesamiento del tejido para su corte en vibratomo

El tejido se post fijó en PFA durante 48 horas en agitación. Transcurrido ese tiempo, se extrajo el cerebro, se incluyó en agarosa al 3% en tampón fosfato 0,1 M (PB; Na₂HPO₄·2H₂O 0,08 M; NaH₂PO₄·H₂O 0,02 M) y se cortó en un vibratomo (Leica VT1000S) en secciones de 50 µm que fueron

cogidas de manera seriada en pocillos. Las secciones fueron mantenidas en PBS/azida a 4 °C hasta su uso.

3.2.2. Procesamiento del tejido para su corte en criostato

Una vez perfundido, el tejido se postfijó en PFA durante 24 horas en agitación. Pasado ese tiempo, se lavó con PBS y se introdujo en una solución de sacarosa al 30% (Merck 1.07687.1000) para crioproteger el tejido. Después de dos noches, el cerebro en el caso de tejido adulto y el cabeza para embrionario, se incluyó en Tissue Tek (Bayer 4583V) y se congeló en nieve carbónica.

El tejido fue cortado en un criostato (Leica 9500) en secciones de 15 µm que fueron recogidas de manera seriada en portaobjetos cargados y mantenidas a -80 °C hasta su uso.

Cuando los animales fueron inyectados con BrdU la postfijación fue sólo de 4 horas.

3.3. Tinción de Nissl

Para visualizar la histología del tejido, algunas secciones se tiñeron con violeta de cresilo. Este colorante básico se une a los ácidos nucleicos cargados negativamente como ARN y ADN, permitiendo distinguir el núcleo, con mayor tinción, del citoplasma.

Para teñir el tejido, las secciones fueron previamente atemperadas y sumergidas unos segundos en agua. A continuación, se introdujeron en una solución de violeta de cresilo (5 g/l, Sigma C1791) durante 15-30 seg y se eliminó el exceso de colorante lavando con agua durante un minuto. Seguidamente, el tejido fue deshidratado en una batería de soluciones de etanol de concentración creciente (desde 50 % al 100 %). Finalmente, el tejido se introdujo en xileno dos veces durante 5 min y se montó en Permount (Fisher W35836).

3.4. Inmunohistoquímica

La inmunotinción de secciones de criostato se realizó sobre portaobjetos. Para lo cual, fueron previamente atemperadas durante 50 min y se delimitó una cámara alrededor de las secciones con un rotulador hidrofóbico. A continuación, se incubaron una hora a temperatura ambiente con la solución de bloqueo/permeabilización (Tabla 28). Posteriormente, se añadió el anticuerpo primario diluido y se dejó una o dos noches a 4 °C o a temperatura ambiente. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS y se montaron en Mowiol.

Los secciones de vibratomo se inmunotiñeron en flotación. Primero, se realizaron tres lavados con PBS para eliminar la azida sódica y se mantuvieron en solución de bloqueo/permeabilización (Tabla 28) durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se incubó con el anticuerpo primario durante dos noches a 4 °C o a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se lavó 3 veces durante 10 min con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario (Tabla 19) durante cuatro horas a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS y se montaron en Mowiol.

Los anticuerpos primarios y secundarios se diluyeron en la solución con la que se bloqueó el tejido (ver dilución en Tabla 29).

Tabla 28: Solución de permeabilización y bloqueo para secciones				
Compuesto	Concentración para criostato	Concentración para vibratomo	Casa Comercial	Nº Catálogo
Tritón X-100	0,2%	0,3%	Sigma-Aldrich	T-8787-100ml
NGS	10%	10%	Millipore	S26-100ml
PBS	1x	1x	-	-

Tabla 29: Anticuerpos primarios usados en inmunohistoquímica				
Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial	Nº Catálogo
BrdU	Rata	1:200	Abcam	ab6326
Caspasa 3 act.	Conejo	1:300	Cell Signaling	700182
DCX	Cobaya	1:3000	Millipore	AB2253
GFAP	Ratón	1:1000	Millipore	MAB360
GFP	Rata	1:1000	Nacalai USA, Inc.	04404-84
Iba1*	Conejo	1:1000	Wako	019-19741
IGF-I	Conejo	1:40	IBT	PABCa
IGF-IR	Conejo	1:50	Cell Signaling Technology, Inc.	3027
Ki67	Conejo	1:1000	Thermo Fisher Scientific Inc.	RM-9106 - S0
Nestina	Ratón	1:50	Millipore	MAB353
Nestina**	Conejo	1:2000	-	
NeuroD1	Conejo	1:50	Abcam	ab16508
P-Akt	Conejo	1:100	Cell Signaling Technology, Inc.	9271
Pax6	Conejo	1:300	Covance	PRB-278P
P-Dab1	Conejo	1:200	Cell Signaling Technology, Inc.	3325
P-Histona H3	Conejo	1:1000	Upstate	06-570
Prox1	Conejo	1:1000	Millipore	AB5475
Prox1	Ratón	1:1000	Millipore	MAB5654
Sinapsina	Conejo	1:500	Millipore	AB1543
Sinaptofisina	Conejo	1:4	ZYMED Laboratories	18-0130
Sox2	Ratón	1:50	R&D Systems	MAB2018
Tbr2	Conejo	1:500	Abcam	AB23345
Tbr2	Conejo	1:1000	Millipore	AB9618
TrkB	Conejo	1:50	Santa Cruz Biotechnology	cs-12-G
TrkC	Conejo	1:50	Santa Cruz Biotechnology	sc-117
vGlut1	Cobaya	1:2500	Millipore	AB5905

* Amablemente cedido por Dra. C. Guaza (Instituto Cajal, CSIC)

** Amablemente cedido por Dr. R. McKay (NIH)

En las secciones de animales inyectados con BrdU, previamente al protocolo descrito para inmunotinciones, las secciones se permeabilizaron con tritón al 0,4% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente, se lavaron con PBS, se incubaron con ácido clorhídrico 30 min a 37 °C y se neutralizó con borato sódico durante 10 min.

En algunos casos, en el penúltimo lavado de la inmunohistoquímica se añadió DAPI (1µg/ml, Sigma D9542-1mg) o Hoestch (1µg/ml, Sigma 861405-100mg) para teñir los núcleos de las células.

3.5. Tinción TUNEL

Para detectar células apoptóticas en secciones, se utilizó la técnica TUNEL siguiendo el protocolo del kit descrito en el apartado 2.10 de material y métodos.

3.6. Análisis realizados en secciones de tejido

3.6.1. Contajes celulares

Para estudiar el papel de IGF-I durante la neurogénesis postnatal-adulta, se determinó en cada sección histológica el número de células positivas para los marcadores específicos de los distintos estadios celulares, desde la célula madre hasta la neurona grano (Fig. 18). Para lo cual, se cuantificó el número de células en 8-22 secciones por animal y genotipo y los datos se representaron como el promedio (media \pm SEM) del número de células por área de la sección (medida con el programa ImageJ).

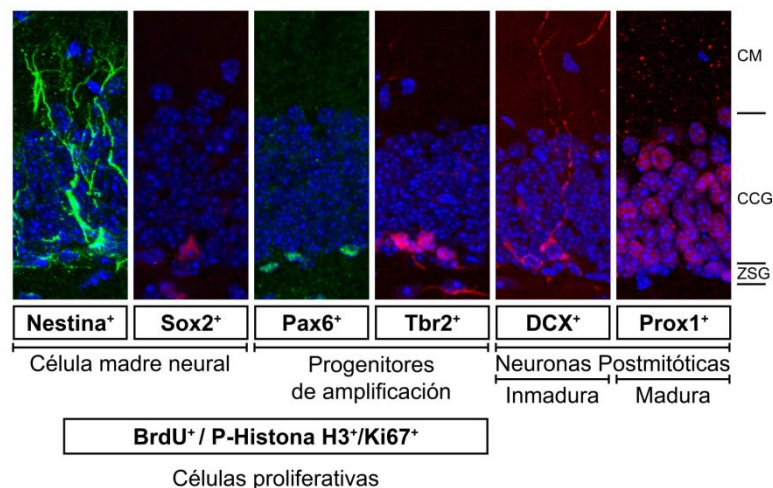


Figura 18: Secuencia celular de la neurogénesis adulta en el giro dentado del hipocampo postnatal-adulto. Esquema que representa, resumidamente, los distintos estadios celulares que tienen lugar durante la transición desde una célula madre neural a una neurona grano madura. Además, se señalan los marcadores moleculares presentes en cada uno de los estadios y que han sido usados en esta tesis. CCG=capa de células grano, CM=capa molecular, ZSG= zona subgranular.

Las secciones utilizadas para los contajes fueron tomadas a lo largo de todo el eje antero posterior del GD, en la zona septal y medial del HP y excluyendo aquellas de la zona más temporal (Fig. 19).

3.6.2. Estimación del volumen y el área

A partir de secciones teñidas con violeta de cresilo, se estimó el volumen y/o el área del HP (GD y asta de Ammón) de ratones WT y KO para IGF-I y del BO e HP de ratones *Igf^{fl/fl}* y *Igf^{Δ/Δ}*, utilizando el método de Cavalieri en el programa *Stereo Investigator* (mbf Bioscience). Para lo cual, se analizaron una sección de cada ocho a lo largo de todo eje anteroposterior y se utilizó una rejilla de 100 μ m de lado dispuesta al azar sobre la sección.

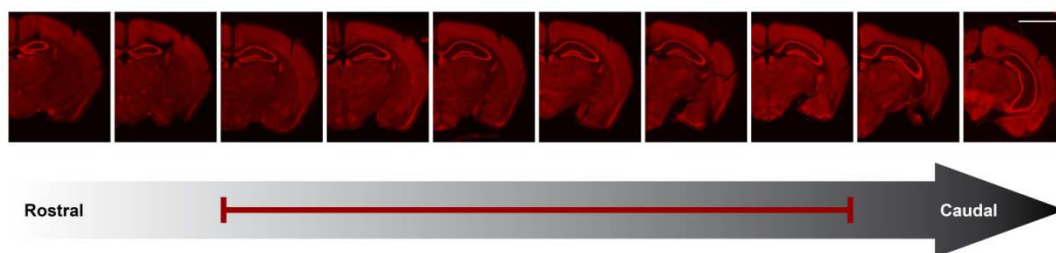


Figura 19: Imágenes del giro dentado a lo largo del eje rostral-caudal. Fotografías de secciones coronales de cerebro de ratón postnatal (P21), teñidas con IP, desde el inicio del giro dentado en la zona septal hasta la parte caudal o zona temporal. La línea roja marca la zona del giro dentado que ha sido objeto de estudio en esta tesis. Barra = 2,2 mm

La estimación de volumen y el área del HP se realizó en la zona septal y medial, zonas en las que hemos centrado el estudio.

3.6.3. Cuantificación de marcadores moleculares de sinapsis

Para determinar si IGF-I afecta a la formación y establecimiento de sinapsis durante el desarrollo embrionario, se analizaron secciones de BO e HP de embriones E18,5 WT y KO para IGF-I teñidas con marcadores de sinapsis (sinaptofisina, sinapsina y vGlut1) (Vicario-Abejon et al. 1998; Mendez-Gomez et al. 2011). Para lo cual, la inmunotinción fue realizada en paralelo para animales de la misma camada y se adquirieron imágenes en un microscopio confocal Leica a 40x con 1,3 de zoom, manteniendo la intensidad del láser y el resto de parámetros constantes para todas las secciones. Se cuantificó la cantidad de marcaje con el programa ImageJ en las siguientes zonas:

- en los glómerulos, en la EPL y en todo el espesor del BO (desde la ZSE hasta los glómerulos).
- en la zona intermedia del HP.

Los datos se expresan como el porcentaje de área marcada en cada una de las zonas delimitadas.

3.6.4. Estudio morfológico y de migración

En las secciones procedentes de animales inyectados con retrovirus, se realizó un estudio morfológico de las neuronas marcadas. De manera que se determinó el número de neuritas primarias y secundarias por células y la longitud total de las neuritas.

Además, se analizó la posición de las células dentro de la capa de células grano del GD (en la ZSG, zona media y dorsal de la capa de células grano o fuera de la capa) para determinar el grado de migración de las células.

4. Técnicas moleculares

4.1. Western blot (Electrotransferencia)

Para analizar los posibles mecanismos implicados en la migración y diferenciación neuronal en el GD, se determinaron los niveles relativos de proteínas relacionadas con la vía de señalización de IGF-I mediante *Western blot*.

También, se utilizó esta técnica para cuantificar los niveles de proteínas relacionadas con la sinapsis en tejidos embrionario de BO e HP.

4.1.1. Lisis y cuantificación de proteínas

Una vez disecado el tejido como se describe en el apartado 2.1 de Material y Métodos, se añadió tampón de lisis (Tabla 30) y se mantuvo en agitación durante 20 min a 4 °C. Después, se centrifugó a 14.000 r.p.m. durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante se mantuvo a -20 °C hasta su uso.

Tabla 30: Tampón de lisis			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
Agua miliQ			
Tris HCl	50 mM	Roche	03573826001
NaCl	300 mM	Merck	1.06404.1000
Triton X-100	1%	Sigma	T8787-100ml
Sodium Ortovanadate	1 mM	Sigma	S6508-10g
Sodium Fluoride	25 mM	Sigma	20114-5g
Sodium pyrophosphate	4 mM	Sigma	221368-100g
EDTA	1 mM	Sigma	E5134-100g
Inhibidor de proteasa		Roche	11836170001

Para determinar la concentración de proteínas en el sobrenadante, se utilizó el kit Micro BCA (Cultek-Pierce 23235) basado en un método colorimétrico. Siguiendo las instrucciones del fabricante, a la mezcla de los reactivos (50% MCA, 48% MCB y 2% MCC) se añadieron 2 µl del sobrenadante y se incubó 1 h a 60 °C. Después, se dejaron los tubos enfriar durante 5 min y se midió la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro. En paralelo a las muestras, se procesaron muestras con concentración conocida de proteína (de 0 a 40 µg/ml) para obtener una curva patrón.

4.1.2. Electroforesis y transferencia

De cada muestra se cogieron 30 µg de proteína, se completó hasta 20 µl con agua y se añadieron 20 µl de tampón de carga Laemmli con β-mercaptoetanol (Bio-Rad 161-0737). Seguidamente, las muestras se incubaron a 91 °C durante 5 min para desnaturalizar las proteínas. A continuación, las muestras fueron cargadas en un gel de acrilamida al 7,5 % y se corrieron a 100 V durante 2 h en tampón de electroforesis (Tabla 31). Las proteínas corrieron en función a su peso molecular al mantener las condiciones desnaturalizantes con la presencia de SDS en el tampón. Además de las muestras, se cargó en uno de los pocillos un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-rad 161-0374). Después, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa en una cubeta de Biorad con tampón de transferencia (Tabla 32) a 90 V durante hora y media a 4 °C.

Tabla 31: Tampón de electroforesis			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
Agua miliQ			
Tris HCl	25 mM	Roche	03573826001
Glicina	192 mM	Merck	5.0019.1000
SDS 20%	0,1%	Bio-Rad	161-0418

Tabla 32: Tampón de transferencia			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
Agua miliQ			
Tris HCl	25 mM	Roche	03573826001
Glicina	192 mM	Merck	5.0019.1000
Metanol	20 %	Lab-Scan	C17C11X

4.1.3. Inmunodetección de las proteínas

Una vez transferidas las proteínas a la membrana, ésta se lavó con tampón TBS (Tabla 33) y se bloqueó con BSA al 5% en TBS durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se incubó con el anticuerpo primario (Tabla 34), diluido en 5% BSA/0,2% Tween 20 (Sigma P5927-100ML)/TBS, durante una noche a 4 °C en agitación. Al día siguiente, se eliminó el exceso de anticuerpo con tres lavados de 0,2% Tween/TBS (TTBS) y se incubó una hora con el anticuerpo secundario (Tabla 35) a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron tres lavabos con TTBS y se añadió reactivo ECL (Amersham, GE Healthcare RPN2209) para revelar la reacción de quimioluminiscencia en una cámara oscura.

Tabla 33: Tampón TBS			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
Agua miliQ			
Tris-Base	20 mM	Roche	03573826001
NaCl	137 mM	Merck	1.06404.1000

Tabla 34: Anticuerpos primarios para Western Blot				
Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial	Nº Catálogo
Akt	Conejo	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Inc	sc-1618
β -tubulina	Ratón	1:1000	Sigma	T4026
P-Akt	Conejo	1:2000	Cell Signaling Technology, Inc.	9271
Sinapsina I	Ratón	1:1000	Chemicon	MAB355
Sinaptofisina	Conejo	1:15	ZYMED Laboratories	18-0130
vGlut1	Cobaya	1:5000	Millipore	AB5905

Tabla 35: Anticuerpos secundarios y reactivos para Western Blot				
Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial	Nº Catálogo
HRP anticonejo	Cabra	1:10000	Boehringer Mannheim	1814141
HRP antiratón	Cabra	1:10000	Biorad	172-1011
Anticobaya biotinilado*	Cabra	1:10000	Vector Labs	BA 7000
HRP Streptavidina*	-	1:10000	Invitrogen	43-4323

*Amablemente cedido por la Dra. R. Moratalla (Instituto Cajal, CSIC)

Después del revelado, la membrana se incubó 15 min a temperatura ambiente con un tampón de lavado (*stripping buffer*, Thermo Scientific 21059) para eliminar los anticuerpos unidos. Una vez lavada la membrana con TBS, se volvió a bloquear e incubar con otro anticuerpo primario.

Una vez obtenidas las películas (Amersham, GE Healthcare) de todas las proteínas en estudio, se realizó la densitometría de las bandas en un densitómetro GS-800 de Biorad y con el *software* Quantity One se estimaron los niveles relativos de proteína.

Además de las proteínas de interés, se determinaron los niveles de β -tubulina como control de carga.

4.2. Análisis de expresión génica

4.2.1. Extracción y purificación de ARNm

Para conocer los genes implicados en la proliferación y supervivencia de CMBO embrionario y adulto en respuesta a FGF-2 y EGF, se realizó un análisis génico a partir de ARN (ácido ribonucleico) extraído de cultivos de CMBO en fase de proliferación. Además, se analizaron los niveles de expresión de *Fgf-2*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3*, *Egf* y *Egfr* en CMBO.

Por otro lado, se extrajo ARN de diversos tejidos de ratones *Igf-1^{fl/fl}* y *Igf-1^{Δ/Δ}* para analizar los niveles de expresión de *Igf-1* tanto en tejido nervioso como no nervioso.

Para extraer el ARN a partir de células se utilizó el reactivo TRIzol (Invitrogen 15596-026). Para lo cual 5 millones de células se recogieron en un mililitro de TRIzol, se añadieron 200 μ l de cloroformo (Merck 1.02445) y se agitó vigorosamente para mezclar. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 seg y se centrifugó la mezcla a 14.000 r.p.m. durante 15 min a 4 °C. La fase acuosa, donde se encuentra el ARN, se transfirió a un tubo nuevo y se añadió un volumen equivalente de etanol al 70%. A continuación, se purificó el ARN por columnas siguiendo las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Qiagen 74104).

Para extraer ARNm (ácido ribonucleico mensajero) a partir de tejido fue necesario trocearlo con un mortero. Para lo cual, todo material fue tratado con hidróxido sódico previamente a su uso para eliminar las enzimas ADNasas existentes. El tejido se colocó en un mortero con nitrógeno líquido y se machacó con la mano del mortero. Con una espátula, se transfirió el tejido a un homogenizador y se añadió un mililitro de TRIzol. Una vez homogeneizado el material, se pasó a un tubo eppendorf y se añadieron 200 μ l de cloroformo. A continuación se procedió a purificar el ARNm siguiendo las mismas indicaciones que se han descrito para células.

Una vez extraído el ARNm, se determinó su concentración en un nanodrop y se comprobó su integridad en un bioanalyzer de la Unidad de genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Madrid. Sólo se procesaron aquellas muestras que poseían un valor de RIN entre 7 y 10.

4.2.2. Análisis de expresión génica en microarrays (micromatrices de ADN)

Para realizar un análisis genómico global de las muestras de CMBOa se realizó un *microarray*. Para lo cual, las muestras de ARN fueron enviadas a la Unidad de genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB). Una vez comprobada la integridad de las muestras, el cDNA (de las siglas en

inglés *complementary deoxyribonucleic acid*) se sintetizó a partir de 2,5 µg de ARN usando un ciclo de marcaje, incluyendo los reactivos controles (Affymetrix, Santa Clara, CA) para producir cRNA (de las siglas en inglés *complementary ribonucleic acid*) biotinilado. A continuación, el cRNA se fragmentó a 94 °C durante 35 min, obteniéndose fragmentos de 35-200 bases.

10 µg del cRNA se hibridó con un *microarray* de genes de ratón (Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 arrays; Affymetrix, Santa Clara, CA, <http://www.affymetrix.com>), el cual contiene 39000 variantes de transcritos correspondientes a 34000 genes de ratón bien caracterizados. A cada muestra se añadió una solución de hibridación (Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico 100mM, 1 M Na⁺, EDTA 20mM en Tween-20 al 0,01%) hasta una concentración final de 0,05 µg/ml. La hibridación se llevó a cabo durante 16 h a 45 °C. Por último, el *microarray* se lavó, se tiñó con estreptavidina-ficoeritrina (Fluidics station 450, Affymetrix) y se escaneó a una resolución de 1,56 µm en un escáner para *microarrays* (GeneChip® Scanner 3000 7G System, Affymetrix). El análisis de los datos, se realizó con el programa GeneChip Operating Software (GCOS).

Posteriormente, los resultados fueron visualizados y procesados con el programa FIESTA desarrollado por la misma Unidad de genómica.

4.2.3. Procesamiento de los datos

Posteriormente, los datos fueron procesados bioinformáticamente en colaboración con Dr. Marcos J. Araúzo-Bravo (Laboratorio de Biología Computacional y Bioinformática, Departamento de Biología Celular y Desarrollo del Instituto Max Planck para Biomedicina Molecular, Múnich, Alemania).

Los datos fueron normalizados usando el algoritmo GCRMA (del inglés *GC content corrected Robust Multi-array Analysis*) (Irizarry et al. 2003). Para el procesamiento posterior y la creación de gráficos, se utilizaron funciones del programa Matlab desarrolladas en el laboratorio del Dr. Araúzo-Bravo. Para comparar la expresión génica de dos poblaciones se consideró un nivel de cambio superior a 1 (en escala log₂). Además, se comparó la similitud entre las distintas muestras mediante un análisis jerárquico (*hierarchical clustering*) utilizando el método de pares agrupados usando el promedio aritmético (UPGMA) (Han et al. 2012).

4.2.4. Análisis de ontologías genéticas (*Gene ontology enrichment analysis*)

Además, los genes sobre o sub expresados al menos una vez (en escala log₂) en la muestra 2d o 4d comparado con la muestra 1d se distribuyeron en categorías tomadas de la base de datos AMIGO (Ashburner et al. 2000) y las diferencias significativas entre los grupos se analizaron según su distribución hipergeométrica (Han et al. 2012).

4.2.5. Diagramas de dispersión (*Pairwise scatter plots*)

Se utilizaron diagramas de dispersión para comparar las distintas muestras (2d o 4d) con el control (1d). Cada punto representa la expresión de un gen en las dos muestras (control vs muestra problema). Los puntos situados en la línea media corresponderán a genes cuya expresión es similar en la muestra y en el control. Aquellos que estén por encima de dicha línea, tendrán una expresión mayor en la muestra que en el control; y los que estén por debajo, menor.

4.2.6. Análisis de vías de señalización KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)

Los datos de vías de señalización fueron obtenidos a partir de la base de datos KEGG (Ogata et al. 2000) y las diferencias de expresión entre el control (1d) y las muestras (2d o 4d) fueron analizadas usando una metodología similar a la empleada para el análisis de ontologías pero en este caso se incluyeron todos los genes.

4.2.7. RT-PCR cuantitativa a tiempo real

Transcripción reversa (RT)

A partir de los cambios en los niveles de expresión de los genes obtenidos en el análisis por *microarray*, se seleccionaron algunos genes candidatos cuya variación entre la muestra problema y el control era superior a 2 (en escala \log_2) y su FDR (de las siglas en inglés, *false discovery rate*) era menor de 0,01 para validar los cambios en su nivel de expresión por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).

En primer lugar, se realizó una transcripción reversa del ARNm extraído para obtener el cDNA. Para lo cual se prepararon 13 μ l de mezcla I de RT partiendo de 500 μ g de ARN (Tabla 36).

Tabla 36: Mezcla I de RT			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
ARN	500 μ g	-	-
Agua destilada	-	Gibco	10977-035
dNTPs 10 mM	0,77 mM	Invitrogen	18427013
Oligo DT	3,8 μ M	Invitrogen	18418-020

La mezcla I se incubó a 65 °C durante 5 min en un termociclador y se dejó reposar un min a 4 °C. A continuación, se añadieron 7 μ l de mezcla II de RT (Tabla 37).

Tabla 37: Mezcla II de RT			
Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
SuperScript III	200 U	Invitrogen	18080-044
DTT (Ditiotreitol)	0,01 mM	Invitrogen	18080-044
Tampón 5x	1x	Invitrogen	18080-044
RNAsa OUT	40 U	Invitrogen	10777-019

En paralelo, se llevó un tubo al que no se añadió enzima como control negativo de la reacción.

Seguidamente, se incubó la mezcla a 50 °C durante 60 min en un termociclador y después a 70 °C 15 min.

Finalmente, se añadió 1 μ l de RNasa H (Invitrogen 18021-014) a cada tubo para eliminar el ARN del híbrido cDNA-ARN y se incubó 20 min a 37 °C.

El cDNA se conservó a -20 °C hasta su uso.

De igual manera se sintetizó el cDNA a partir del ARNm de tejidos.

qPCR

Para cuantificar los niveles de expresión de un determinado gen, se realizaron qPCR a partir de cDNA sintetizado.

En primer lugar, se diseñaron cebadores específicos del gen en estudio con el programa Lasergene (Tabla 38). Los productos de la PCR obtenidos para cada uno de los genes fueron secuenciados para comprobar que se correspondían con el gen en cuestión.

Tabla 38: Cebadores para qPCR		
Gen	Cebador (5'-3')	Tamaño (bp)
<i>Adm</i>	Sentido	TTGGACTTTGGGGTTTTGCTACTGT
	Antisentido	GGAAAGCGAGTGAACCCAATAACATC
<i>Bex1</i>	Sentido	CTCCAGCCCGCCATCCCTAAC
	Antisentido	GCCTATCCTTGCCTTCTCCTCTTTCTA
<i>Calb1</i>	Qiagen N° QT00159943	
<i>Cox6a2</i>	Sentido	GTGCCATTCTAGCCTCCCTTTGA
	Antisentido	GGGAAGAGCCAGCACAAAGGTCA
<i>Cryab</i>	Sentido	GGCACCAGCTGGATTGACACC
	Antisentido	CTCAATCACGTCCCCCAGAACCTT
<i>Dcl1</i>	Sentido	CTCGGGCAAGTCACCAAGTCCATCAC
	Antisentido	TTCCTCAGACTCTCCCTCCTCCATC
<i>Diras2</i>	Qiagen N° QT01196356	
<i>Dscaml1</i>	Sentido	CATGTGGCTGGTAACTTCTCTCTGC
	Antisentido	TCACGTGCTGCAGGGAGTCATTAC
<i>Egf</i>	Sentido	GAGTCTGCCTGCGGATGGTA
	Antisentido	TCTGGAGCCCTTTCGTGACAC
<i>Egfr</i>	Sentido	GGTGCTGTAAACAGAGGACAACATAGAT
	Antisentido	GGCTGATTGTGATAGACAGGGTTC
<i>Fgf-2</i>	Sentido	AAGCAGAAGAGAGAGGAGTTGTGTC
	Antisentido	CCCGTTTTGGATCCGAGTTTAT
<i>Fgfr1</i>	Sentido	CAGTGCCCTCTCAGAGACCTACG
	Antisentido	TAACGGCTCATGAGAGAAGACAGA
<i>Fgfr2</i>	Sentido	CGAAGACTTGGATCGAATTCTGACTC
	Antisentido	AAGAGCTCCTTGTGTGCGGGTAAC
<i>Fgfr3</i>	Sentido	CAAGCAGTTGGTAGAGGATTTAGAC
	Antisentido	GTAGCAGGTCATGGGTGAACAC
<i>Gpr17</i>	Sentido	TGTCCTTCTCTCTGGGTCTTCTG
	Antisentido	GCCAGGGAGGAGTTGTGAGTCAG
<i>Ier3</i>	Sentido	CGCGCGTTGAACACTTCTCG
	Antisentido	CACGGCGCTGGTAGCATCCTC
<i>Igf1</i>	Sentido	TGGTGGATGCTCTTCAGTTCGTGT
	Antisentido	TGGCGCTGGGCACGGATAG
<i>IGFBP3</i>	Sentido	CTGAGGGCGCTGCTGAATGG
	Antisentido	ATGGAACCTTGAATCGGTCACTCG
<i>Ndr2</i>	Sentido	TGCCAGGACAAACACCCGAGACT
	Antisentido	GCCATACACAGTAAAAGTGACCGAGC
<i>Npnt</i>	Sentido	GGAGGTGGCCAGGCAAATAGT
	Antisentido	GGCAGCAGCATGTATCCGTTGAGA
<i>Pla2g7</i>	Sentido	CGTGCTAGGATCTGACTCGTCTG
	Antisentido	CCAGAGCCGGCAGCAGACA
<i>Pvr</i>	Sentido	ATGGCTGCTGCTGCTGTTCTGC
	Antisentido	TCGAGATGGCCAGAGATGCGTTC
<i>S100b</i>	Sentido	GAGGACTCCAGCAGCAAAGGTGAC
	Antisentido	CCCGGAGTACTGGTGAAGACATC
<i>Gapdh</i>	Sentido	GGTGAAGGTCGGTGTGAACG
	Antisentido	CTCGCTCCTGGAAGATGGTG

Además, se determinó la cantidad óptima de ARNm necesaria para que se produjese la RT, a partir de diluciones seriadas 1:2 en un rango desde 1 µg a 125 ng, y el rango dinámico de amplificación para cada pareja de cebadores, a partir de diluciones seriadas del cDNA. Para todos los genes, se partió de 500 ng de ARNm y se diluyó el cDNA 1:10 para todos los cebadores.

Una vez establecidas las condiciones óptimas, se llevó a cabo la reacción de PCRq con el reactivo *Syber Green* (Applied Biosystems, 1006226) para cada muestra por triplicado. A la mezcla de *Syber Green* se añadieron los cebadores (1 mM), 2 µl de la mezcla de cDNA y se insertó en un termociclador de PCR cuantitativas (Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR Software v2.0). Las condiciones de la PCR fueron:

- Incubación inicial: 50 °C 2 min.
- Desnaturalización inicial: 95 °C 10 min.
- 40 ciclos:
 - Desnaturalización del cDNA: 95 °C 15 seg.
 - Acoplamiento de cebadores y extensión: 60 °C 1 min.
- Curva de disociación (o de *Melting*): de 60 °C a 95 °C (0,5 °C cada 30 seg)

Para realizar la cuantificación se utilizó el método de comparación ΔCT (ya que para todos los genes se obtuvo una pendiente entre 0,1 y -0,1 en la recta resultante de representar la CT de cada gen con respecto a la CT de la *Gadph*, y por tanto una misma eficiencia), de manera que los valores de CT obtenidos para cada gen se normalizaron con respecto al valor de CT de las *Gapdh* (Pfaffl 2001; Nolan et al. 2006). Finalmente, se representaron como los niveles de cambio de la muestra (en escala \log_2) con respecto al control, al que se dio un valor de 0. En algunos casos se representaron los niveles de ARNm relativos crudos (sin expresar en función del control).

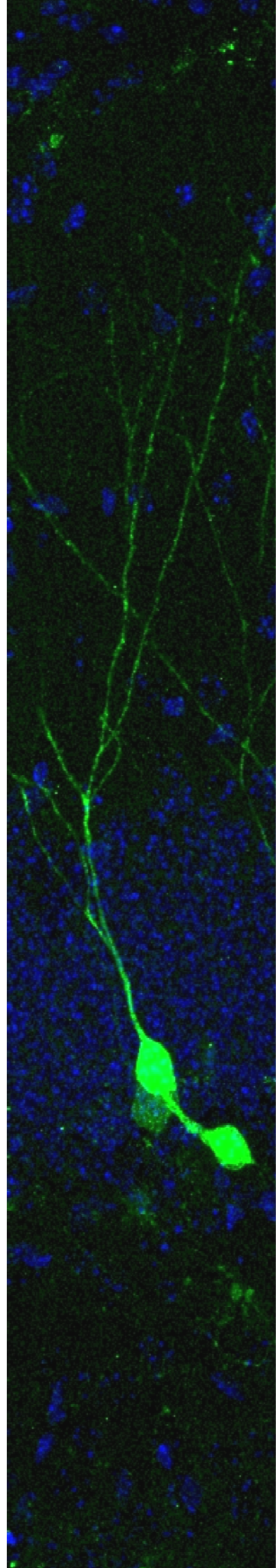
5. Análisis estadístico

Para realizar todos los test estadísticos y los gráficos de los resultados se utilizó el programa GraphPad Prism. El test estadístico varió según el número de grupos a comparar:

- Dos grupos: t de *Student* de dos colas.
 - Test no pareado: En la mayoría de los casos se usó el test no pareado.
 - Con corrección de Welch: si las varianzas fueron distintas en el test F de Snedecor.
 - Test pareado: cuando las tendencias se mantuvieron entre experimentos o camadas pero la desviación resultó muy grande entre experimentos.
- Tres grupos:
 - ANOVA de una vía y post test de Bonferroni: si las varianzas fueron iguales en el test de Bartlett.
 - Test no paramétrico de Kruskal-Wallis y post test de Dunns: si las varianzas fueron distintas.

Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando se obtuvo un valor de P menor de 0,05 ($p < 0,05$).

Resultados



1. Papel de FGF-2 y EGF en el mantenimiento y supervivencia de las CMBO

Se ha demostrado que la adición de los factores de crecimiento FGF-2 y EGF es crítica para el mantenimiento y expansión de CMN *in vitro* como neurosféricas en flotación, ya que su ausencia provoca un cese de la división celular, iniciándose procesos de diferenciación y/o muerte (Reynolds y Weiss 1992; Gritti et al. 1996; Vicario-Abejón et al. 2003; Vergaño-Vera et al. 2009). Sin embargo, no existe una estandarización en los protocolos utilizados para el mantenimiento de CMN, ni se conocen completamente los mecanismos moleculares y celulares implicados en la supervivencia y mantenimiento del estado indiferenciado de las CMN en respuesta a dichos factos.

Por ello, nos propusimos analizar los efectos conjuntos de FGF-2 y EGF (FGF-2/EGF) en la proliferación, la progresión del ciclo celular, muerte y diferenciación, así como los cambios de expresión génica que nos pudieran identificar mecanismos moleculares relacionados con la supervivencia e inicio de la diferenciación de CMN. Para lo cual, cultivamos CMBOe y CMBOa en medio estándar (DMEMF12 N2) variando la frecuencia de adición de los factores mencionados: diariamente (condición 1d), cada dos días (condición 2d) o cada cuatro (condición 4d).

1.1. Efecto de FGF-2 y EGF en la proliferación y muerte celular de CMBO

1.1.1. Análisis de la proliferación celular y estado indiferenciado en cultivos en flotación

La primera aproximación utilizada para estudiar la proliferación celular de CMBO fue el cultivo de las mismas como neurosféricas en flotación. Para lo cual, se sembraron CMBO embrionario y adulto en medio DMEMF12 N2 mantenidas con distinta frecuencia de adición de factores hasta alcanzar confluencia. En todos los experimentos, las tres condiciones experimentales (1d, 2d y 4d) se realizaron en paralelo, sembrándolas a la misma densidad y manteniendo constante los intervalos entre pases. Para cada población se estableció el día del pase como el día en el cual los cultivos de la condición 1d adquirirían confluencia (cada 4 días para CMBOe y cada 7 días para CMBOa, Fig. 20 A). De manera que, en los cultivos de CMBOe de la condición 2d y 4d habían pasado 2 y 4 días, respectivamente, desde la última adición FGF-2/EGF, mientras que en los cultivos de CMBOa en esas mismas condiciones el intervalo sería de uno y tres días. Esta diferencia es debida a que las CMBOa de la condición 1d sembradas a 5.000 cél/cm² (densidad estándar), después de ocho días en cultivo alcanzan una confluencia excesiva lo que provoca un aumento considerable de la muerte celular. Por ello, decidimos mantener la misma densidad en las CMBOa que en las CMBOe y realizar los experimentos después de 7 días en cultivo (día de confluencia de la condición 1d sin observar un aumento de la muerte).

Tanto las CMBOe como las CMBOa formaron neurosféricas en las tres condiciones de adición de FGF-2/EGF (Fig. 20). Sin embargo, en los cultivos de CMBOe y CMBOa mantenidos con menor frecuencia de FGF-2/EGF, las neurosféricas formadas fueron de menor tamaño que las obtenidas en los cultivos con aporte diario de factores. En las CMBOe sólo se observó la reducción de tamaño en la condición 4d (Fig. 20 B-D) mientras que en las células de origen adulto se observó una disminución progresiva del tamaño a medida que la frecuencia de adición era menor (Fig. 20 F-H). Esta reducción del tamaño de las neurosféricas, fue acompañada de un menor número de células recolectadas en el

momento del pase. El número total de CMBOe recogidas fue un 36 % menor en cultivos suplementados cada 4 días con FGF-2/EGF comparado con los cultivos mantenidos con una administración diaria ($P < 0,01$; *t* de *Student*) (Fig. 20 E). En los cultivos de CMBOa se produjo una reducción de un 35% en el número de células obtenidas en la condición 2d ($P < 0,05$; ANOVA), y de un 58% con administración cada 4 días ($P < 0,001$; ANOVA) (Fig. 20 I). Resultados similares, fueron obtenidos cuando cultivamos las células con DMEMF12 B27, por lo que los resultados se combinaron y el resto de estudios se realizaron en medio DMEMF12 N2.

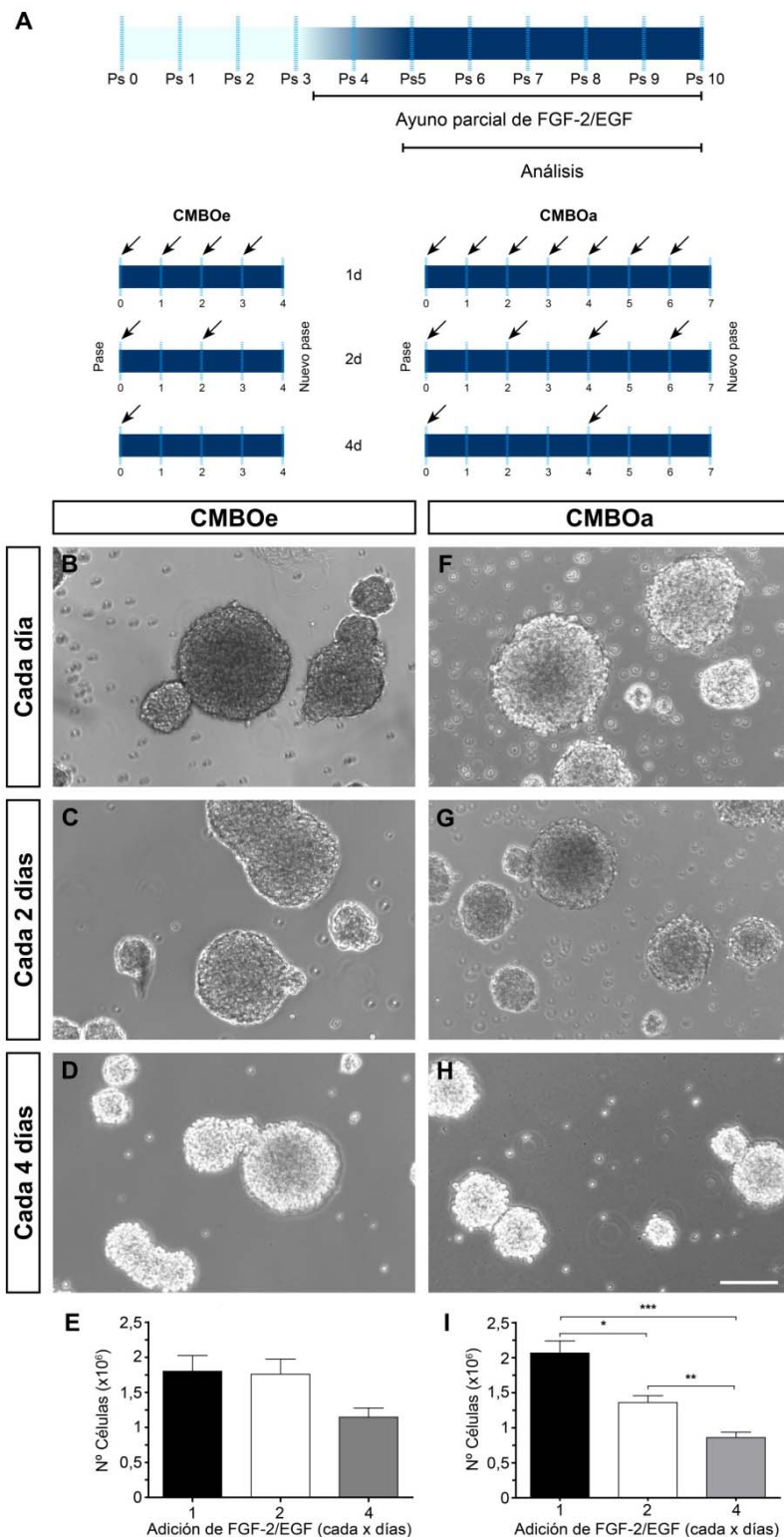


Figura 20: Crecimiento de neurosféricas de CMBO embrionario y adulto cultivadas en presencia de FGF-2 y EGF (FGF-2/EGF) añadidos a distintos intervalos. El esquema en A muestra el diseño experimental para el estudio del efecto de FGF-2 y EGF en CMBO. En todos los experimentos, las tres condiciones experimentales se realizaron en paralelo, sembrándolas a la misma densidad y manteniendo constante los intervalos entre pases. Las CMBOe (B-E) y CMBOa (F-I) fueron cultivadas como neurosféricas en flotación y los factores FGF-2/EGF se añadieron cada día (B y F), cada 2 días (C y G) o cada 4 días (D-H). Las neurosféricas fueron disgregadas mecánicamente, cada 4 días para CMBOe y cada 7 para CMBOa, y se determinó, a distintos pases, el número de células viables mediante el método de azul de tripano. Las imágenes muestran neurosféricas representativas de CMBO E13,5 y CMBOa en cada condición experimental. Los gráficos de barras muestran el número de células obtenidas el día del pase en los cultivos de CMBOe (E) y CMBOa (I) en cada régimen de adición de factores. Los resultados se indican como la media \pm SEM de los conteos de 24-35 cultivos distintos por condición. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ (test de Kruskal-Wallis seguido del análisis *post hoc* utilizando el test de comparación múltiple de Dunns). Barra de escala (H) = 121,02 μ m.

Esta reducción en el tamaño de las neurosféricas mantenidas en ayuno parcial de FGF-2/EGF, podría ser debida a una menor proliferación celular y/o a un aumento de la muerte y de la diferenciación celular. Para analizarlo, cultivamos CMBOa en flotación añadiendo FGF-2/EGF a diferentes intervalos y, el día del pase, se añadió una dosis de BrdU durante 30 min para marcar las células proliferativas (Fig. 21 A-C). En estas condiciones, las neurosféricas de cultivos tratados con factores cada 2 días o 4 días presentaron un número de células DAPI⁺ menor que las tratadas diariamente; 1,4 veces menor en la condición 2d (ANOVA estadísticamente no significativo, t de Student $P < 0,05$) y 3,1 veces en la 4d (ANOVA, $P < 0,001$). La diferencia en el número de células DAPI⁺ por neurosfera en la condición 2d comparado con 4d (reducción de 2 veces) también resultó estadísticamente significativa (ANOVA, $P < 0,001$) (Fig. 21 J). Además, las neurosféricas de la condición 4d alcanzaron tamaños relativamente pequeños ($0-0,75 \times 10^6 \mu\text{m}^3$) sin superar volúmenes mayores de $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ (Fig. 21 K), sí presentes en las otras dos condiciones (1d y 2d). Además, el porcentaje de células BrdU⁺ disminuyó un 43% en cultivos 2d (ANOVA, $P < 0,01$) mientras que en los cultivos 4d no encontramos diferencias significativas (Fig. 21 A-C y L).

Seguidamente, quisimos analizar si la menor frecuencia de factores en cultivos de CMBOa promovía un aumento de la diferenciación celular durante la fase de proliferación mediante tinción con anticuerpos para marcar astrocitos (GFAP) y neuronas (TuJ1). En las neurosféricas cultivadas con menor frecuencia de FGF-2/EGF se encontraron porcentajes mayores de astrocitos GFAP⁺ (aumento del 70,9% en 4d; ANOVA, $P < 0,05$) (Fig. 21 D-F y M) y neuronas TuJ1⁺ (aumento progresivo según disminuía la frecuencia de adición de factores; 0,00%, 0,09% y 0,19%, en las condiciones 1d, 2d y 4d, respectivamente) (Fig. 21 G-I y N). Estos resultados indican que la menor adición de factores en cultivos de CMBOa produce una reducción del tamaño de las neurosféricas formadas, reflejada en el menor número de células DAPI⁺ y la reducción del volumen sin afectar, aparentemente, la capacidad proliferativa. Además, la ausencia diaria de factores promueve el inicio de la diferenciación de las CMBOa.

A continuación, realizamos el mismo estudio en cultivos de CMBOe (Fig. 22), observándose un menor número de células DAPI⁺ por neurosfera en la condición 4d (reducción del 32-34%; ANOVA, $P < 0,05$) respecto a las otras dos condiciones estudiadas y una mayor abundancia de neurosféricas de tamaños pequeños ($0-0,75 \times 10^5$ y $0,75-1,5 \times 10^5 \mu\text{m}^3$) (Fig. 22 J y K). El porcentaje de células BrdU⁺, GFAP⁺ y TuJ1⁺ por neurosfera fue similar en las tres condiciones (Fig. 22 L-N). Estos resultados indican que el ayuno parcial de factores, altera en menor medida el crecimiento y mantenimiento del estado indiferenciado de las CMBOe que el de las CMBOa, viéndose sólo afectado el tamaño de las neurosféricas en la condición 4d.

1.1.2. Estudios de ciclo celular

Para analizar con mayor detalle los efectos de FGF-2 y EGF durante la fase de proliferación, realizamos un estudio de ciclo celular.

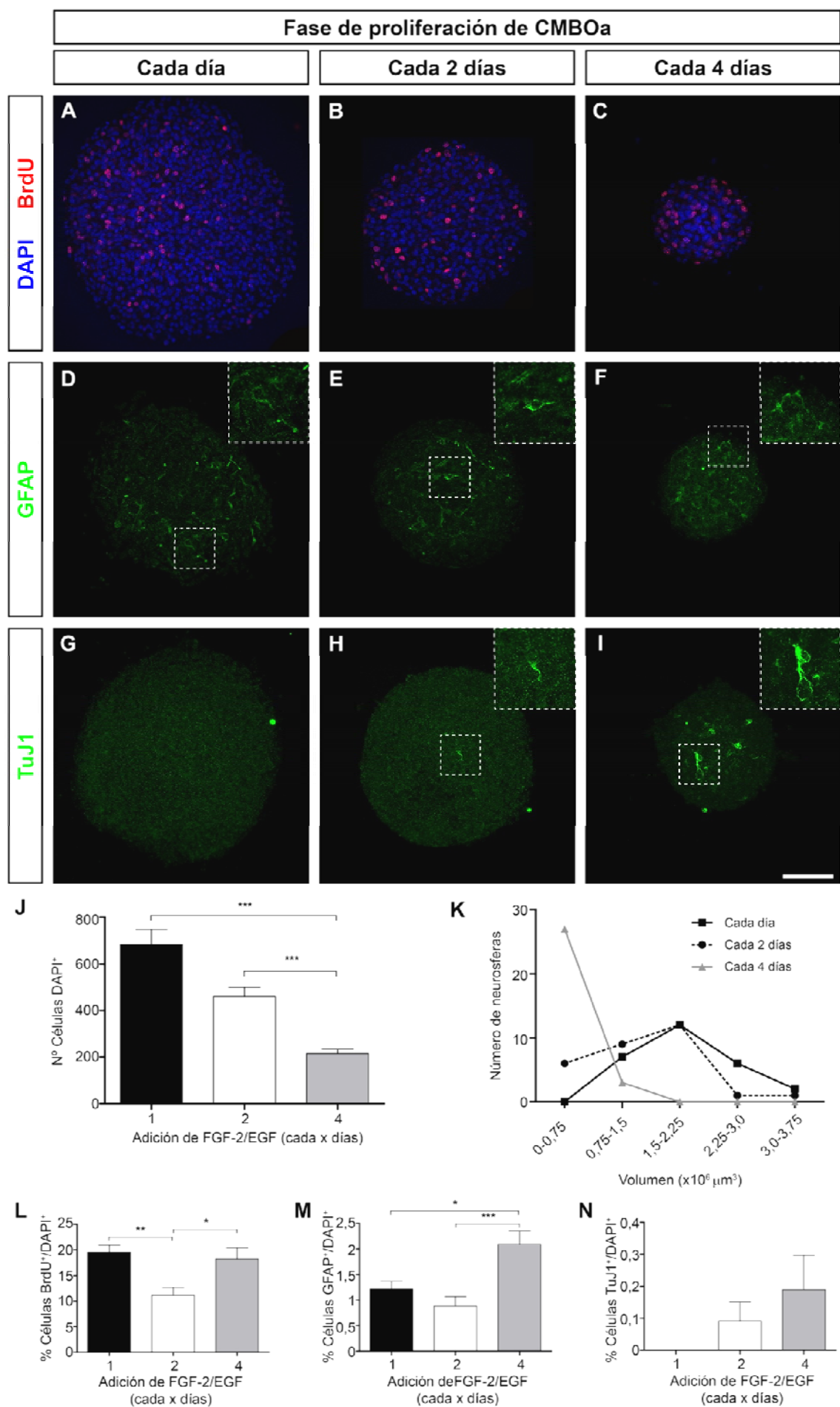


Figura 21: Efecto del régimen de adición de FGF-2/EGF en el tamaño de las neuroferas, la proliferación y la expresión de marcadores de diferenciación en cultivos de CMBOa. Las CMBOa fueron cultivadas como neuroferas en presencia de FGF-2/EGF añadidos a distintos intervalos. Tras 7 días en cultivo, se añadió BrdU (5 μ M) durante 30 min y se recogieron las neuroferas en matrigel para poder ser fijadas, inmunoteñidas con distintos anticuerpos y teñidas con DAPI. Las imágenes muestran neuroferas representativas de CMBOa suplementadas con factores cada día (A, D y G), cada 2 días (B, E y H) y cada 4 días (C, F e I) inmunoteñidas con anti-BrdU (A-C), anti-GFAP (D-F) y anti-TuJ1 (G-I). Los gráficos de barras muestran el número de células DAPI⁺ en un plano de confocal por neurosfera (J), y el porcentaje de células BrdU⁺ (L), GFAP⁺ (M) y TuJ1⁺ (N). Los datos son la media \pm SEM de 15-30 neuroferas. En el gráfico lineal se representa la distribución de las neuroferas en grupos en función de su volumen (K). *P < 0,05, **P < 0,01 y ***P < 0,001 (ANOVA de una vía seguida del análisis *post hoc* utilizando el test de Bonferroni). Barra de escala (I) = 77,51 μ m; insertos 39,0 μ m.

En primer lugar, analizamos el porcentaje de células presentes en cada una de las fases del ciclo celular el día del pase, tras 4 días *in vitro* (DIV) en cultivos en flotación de CMBOe o 7 DIV para CMBOa, días en los que se adquiría confluencia en la condición 1d (Fig. 23 A-H). En ambas poblaciones celulares, se observaron porcentajes de células similares en cada una de las fases independientemente de la cantidad de FGF-2/EGF recibida. Sin embargo, cuando comparamos dichos porcentajes entre las dos poblaciones, encontramos que en los cultivos de CMBOa había un mayor porcentaje de células en G₀/G₁ (81,3% de media) que en los de CMBOe (70,3%), y consecuentemente, un porcentaje menor en fase S (un 9,9% comparado con un 15,4%) y en G₂/M (8,8% comparado con un 14,2%) (t de *Student* P<0,001) (Fig. 23 I). Los resultados obtenidos demuestran la presencia de un mayor porcentaje de células quiescentes o retenidas en G₀/G₁, en los cultivos de CMBOa comparado con los de CMBOe, en el momento del pase.

A pesar de que el día del pase no encontramos diferencias en el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo en cultivos de CMBOe y CMBOa, las reducciones encontradas en el tamaño y el número de células por neurosfera podrían deberse a cambios ocurridos en días previos; por lo que analizamos el ciclo celular en cultivos de CMBOe tras 2, 3 y 4 DIV y en cultivos de CMBOa tras 5, 6 y 7 DIV mantenidas en las dos condiciones extremas de adición de FGF-2/EGF (1d y 4d) (Fig. 24). En los cultivos de CMBOe no se encontraron diferencias claras en el porcentaje de células en ninguna de las fases del ciclo entre la condición 1d y 4d en ninguno de los días analizados, exceptuando unos ligeros cambios en la proporción de células G₂/M a 2 y 3 DIV (Fig. 24 A-C). En el caso de los cultivos de CMBOa no se encontraron diferencias entre la condición 4d y la 1d los dos primeros días de cultivos analizados. Por el contrario, tras 7 DIV los porcentajes de células en fase G₀/G₁ fueron mayores en la condición 4d (incremento del 6,35%) y menores en S y G₂/M (disminución del 10,77% y del 41,56%, respectivamente) comparado con 1d (diferencias no significativas, t de *Student*) (Fig. 24 D-E). Asimismo, se observó que las CMBOe mantienen prácticamente constante la proporción de células en cada fase del ciclo a lo largo del tiempo en cultivo, mientras que en los cultivos de CMBOa se detectó un aumento progresivo del porcentaje de células en fase G₀/G₁ (Fig. 24 D). Nuestros resultados indican que la distinta adición de factores no afecta al porcentaje de células presentes en cada una de las fases del ciclo en cultivos de CMBOe. Sin embargo, las CMBOa podrían requerir de un aporte continuado de FGF-2 y EGF para mantener su capacidad de división celular.

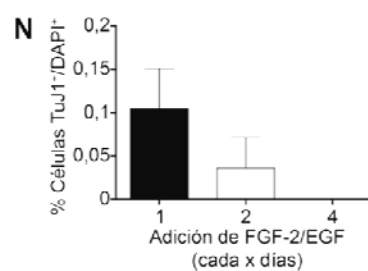
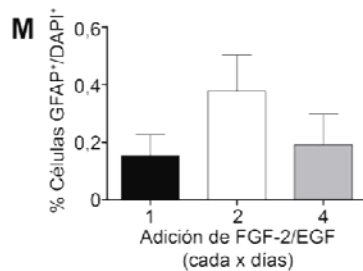
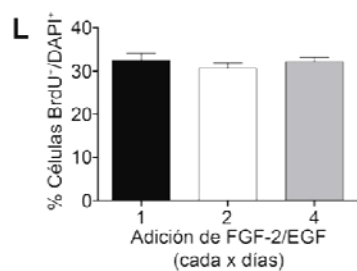
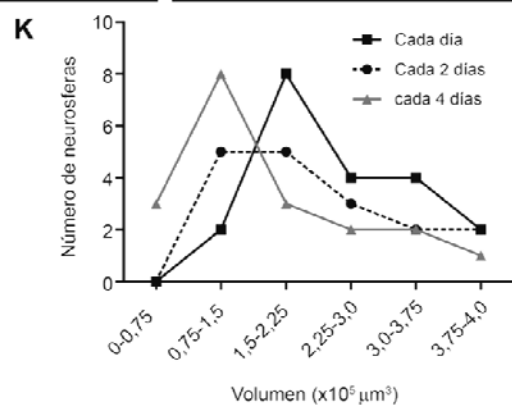
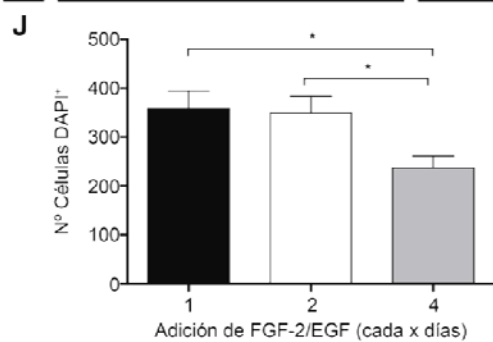
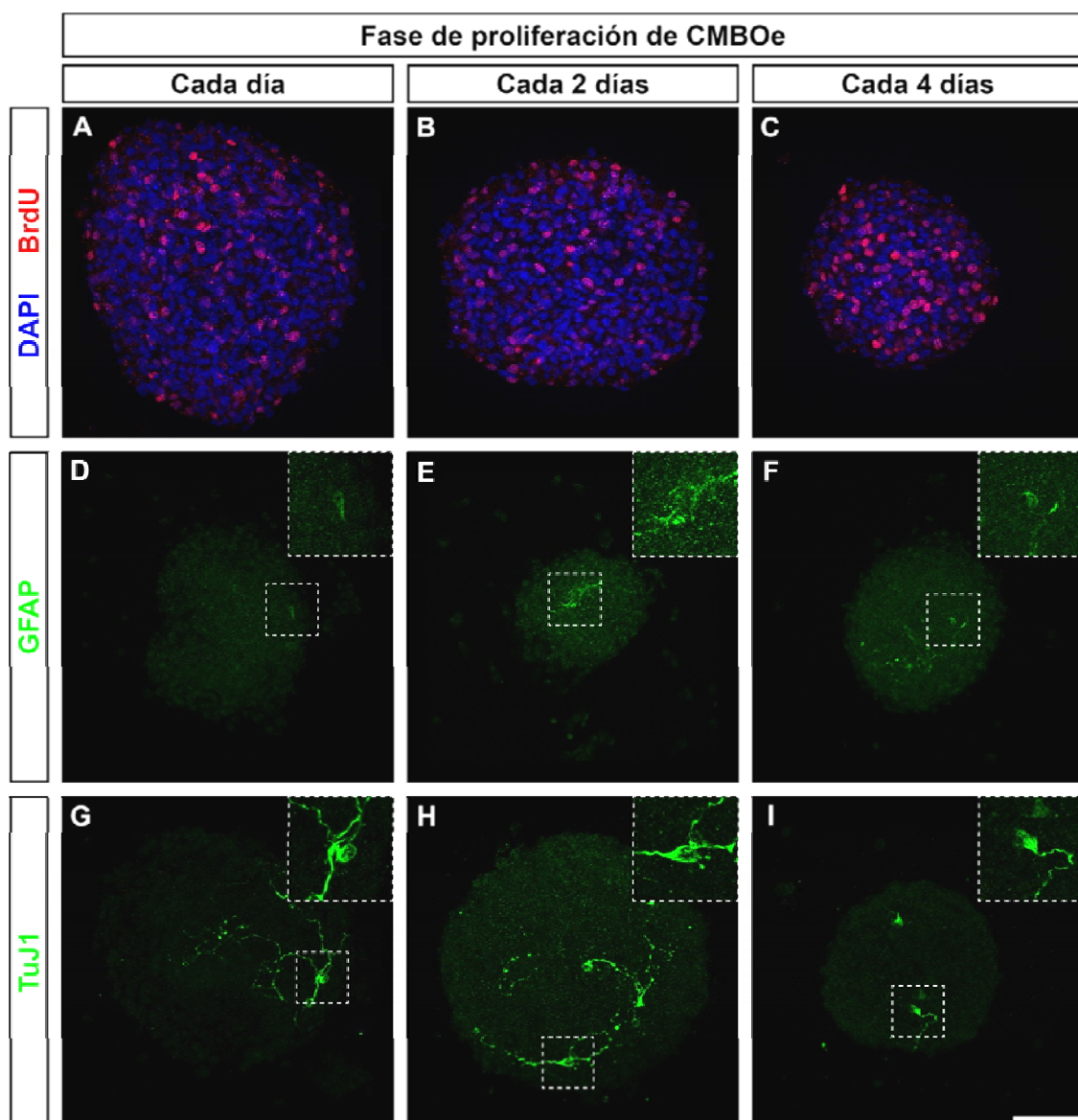


Figura 22: Efecto del régimen de adición de FGF-2/EGF en el tamaño de las neuroferas, la proliferación y la expresión de marcadores de diferenciación en cultivos de CMBOe. Las CMBOe fueron mantenidas como neuroferas en presencia de FGF-2/EGF suministrados cada día, cada 2 días o cada 4 días. Transcurridos 4 días en cultivo, se añadió BrdU (5 μ M) durante 30 min y se recogieron las neuroferas en matrigel para poder ser fijadas, inmunoteñidas con distintos anticuerpos y teñidas con DAPI. Las imágenes muestran neuroferas representativas de CMBOe crecidas en cada condición (cada día: A, D y G; 2 días: B, E y H; 4 días: C, F e I) inmunoteñidas con anti-BrdU (A-C), anti-GFAP (D-F) y anti-TuJ1 (G-I). Los gráficos de barras muestran el número de células DAPI⁺ en un plano de confocal por neurosfera (J), y el porcentaje de células BrdU⁺ (L), GFAP⁺ (M) y TuJ1⁺ (N). Los datos son la media \pm SEM de 15-30 neuroferas. En el gráfico lineal se representa la distribución de las neuroferas en grupos en función de su volumen (K). *P < 0,05 (ANOVA de una vía seguida del análisis *post hoc* utilizando el test de Bonferroni). Barra de escala (I) = 77,51 μ m; insertos 39,0 μ m.

1.1.3. Estudios de muerte celular

A continuación, estudiamos el efecto de FGF-2/EGF suplementados a distintos intervalos sobre la muerte celular para lo que medimos el porcentaje de células viables, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y muertas en cultivos de CMBOe y CMBOa el día del pase, día 4 y 7, respectivamente (Fig. 25). En los cultivos de CMBOe no se encontraron diferencias en ninguno de los grupos de muerte celular (Fig. 25 A-D). En cultivos de CMBOa, el número de células viables (anexina⁻ y IP⁻), así como la proporción de células anexina⁺ y IP⁻ (apoptóticas tempranas) o anexina⁺ y IP⁺ (apoptóticas tardías), fue similar en las tres condiciones experimentales. Por el contrario, el porcentaje de células muertas fue mayor en CMBOa cultivadas con FGF-2/EGF cada 4 días (incremento del 78,9% en la condición 4d comparado con 1d; ANOVA, P<0,05) (Fig. 25 E-H). Estos datos indican que las CMBOa son más dependientes que las CMBOe de FGF-2 y EGF para su supervivencia, ya que la ausencia parcial de dichos factores conlleva un aumento de la muerte celular.

Al igual que para el ciclo celular, quisimos realizar un seguimiento de la muerte celular en los distintos días de cultivo en las condiciones 1d y 4d (Fig. 26). En los cultivos de CMBOe crecidas con FGF-2/EGF cada día o cada 4 días, no se observaron diferencias en el porcentaje de células viables ni en los distintos grupos de muerte celular (Fig. 26 A-D). Adicionalmente, se observó que la viabilidad de las CMBOe era menor en los dos primeros días en cultivo, mientras que en los dos últimos días antes del pase fue del 85-90% (Fig. 26 A). Por el contrario, las CMBOa presentaron una pérdida progresiva de la viabilidad celular en los cultivos de la condición 1d (del 80,13 % al 71,50 %), la cual se vio agravada por la menor adición de factores (del 88,75 % al 45,55 %; P=0,08 t de *Student* no pareado; P<0,001 t de *Student* pareado) (Fig. 26 E). De igual manera, los porcentajes de células apoptóticas tempranas (P=0,37), tardías (P=0,09) y muertas (P=0,26 t de *Student* no pareado; P<0,08 t de *Student* pareado) fueron mayores en la condición 4d a lo largo del cultivo comparado con la condición 1d. A pesar de que algunos cambios no alcanzaron significatividad estadística por la variabilidad entre cultivos, nuestros resultados sugieren que la menor adición de FGF-2 y EGF provoca un aumento progresivo de la muerte celular en cultivos de CMBOa, no afectando apenas a las CMBOe.

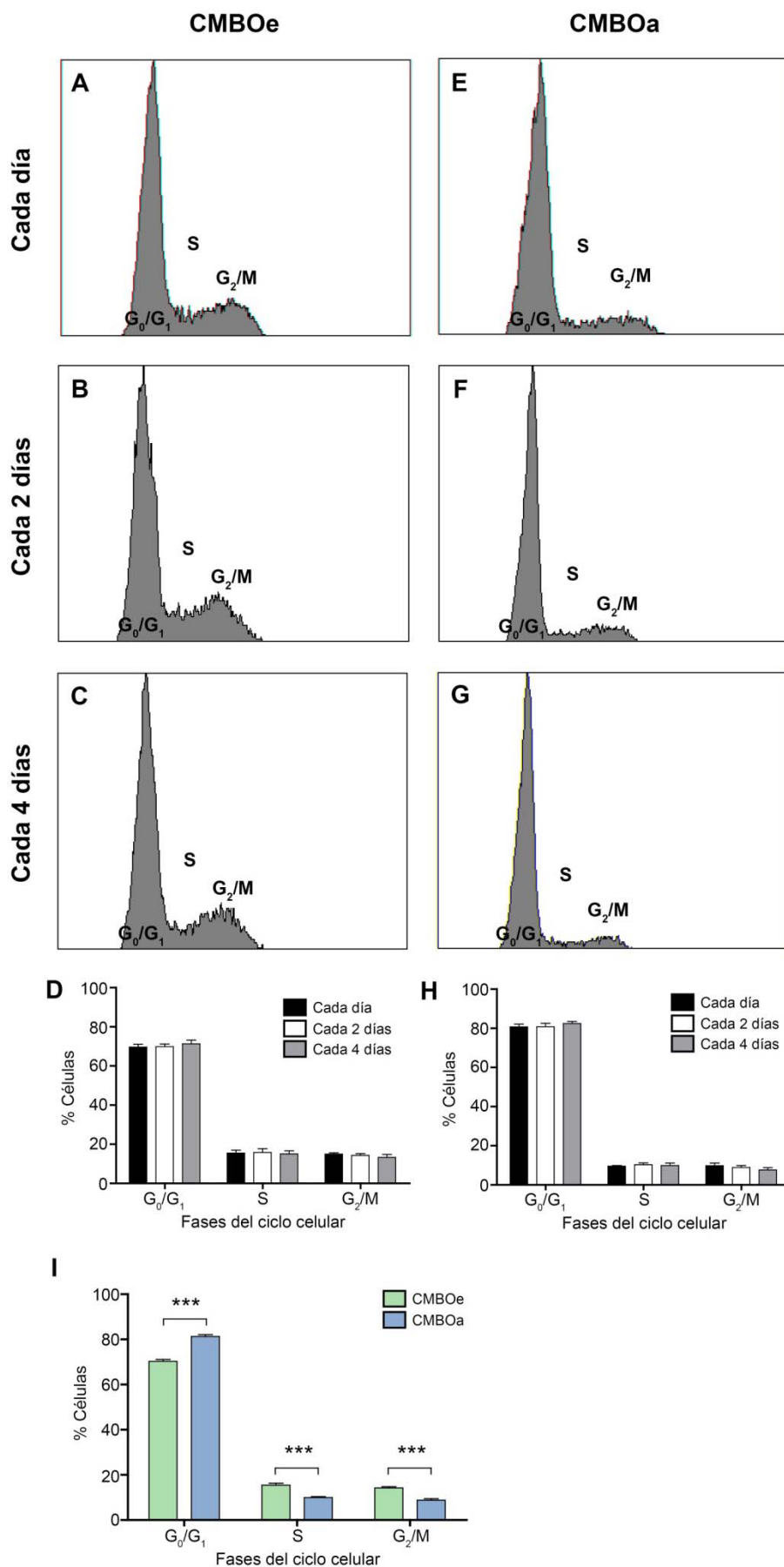


Figura 23: Influencia sobre el ciclo celular de la edad del animal del que se obtienen las CMBO y de la frecuencia de adición de FGF-2/EGF. Las CMBOe (A-D) y CMBOa (E-H) fueron crecidas como neurosféricas con adición de factores cada día, cada 2 días y cada 4 días. El día del pase (4º día en cultivos de CMBOe y 7º día en cultivos de CMBOa), las CMBO fueron disgregadas mecánicamente, fijadas con etanol, teñidas con IP y analizadas por citometría de flujo. Las imágenes muestran perfiles de ciclo representativos de CMBOe (A-C) y CMBOa (E-G) en cada condición. En los gráficos se representa el porcentaje de CMBOe (D) y CMBOa (H) en cada una de las fases del ciclo celular. En el gráfico inferior se indican los porcentajes de células en cada una de las fases del ciclo comparando las dos poblaciones celulares, CMBOe y CMBOa (I). Los resultados son la media \pm SEM de 4 cultivos. *** $p < 0,001$ (t de Student). IP = Ioduro de propidio.

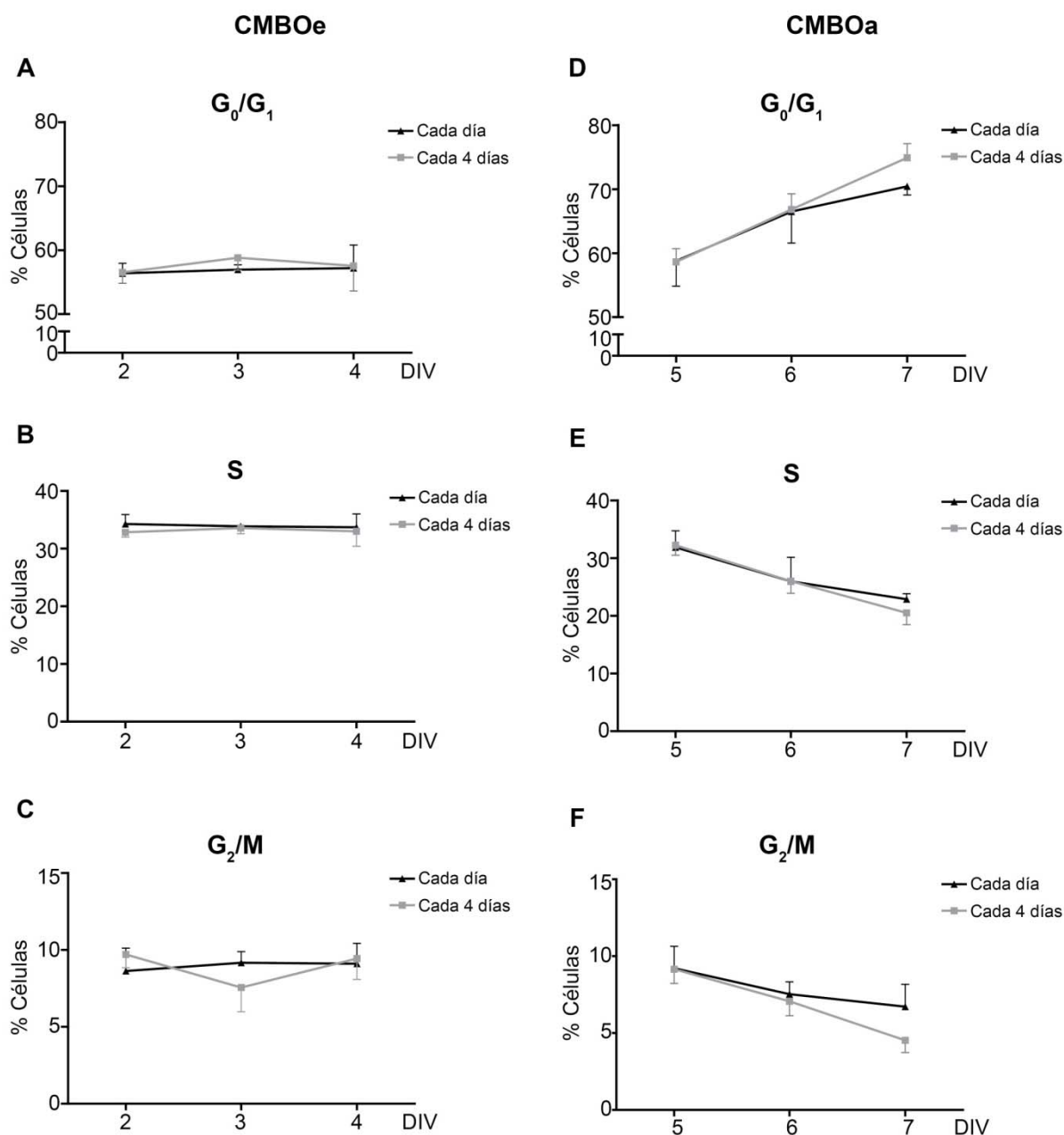


Figura 24: Análisis del ciclo celular a lo largo del cultivo de CMBOe y CMBOa mantenidos con distinta frecuencia de adición de FGF-2/EGF. Las CMBOe (A-C) y CMBOa (D-F) fueron crecidas como neurosféricas con adición de factores cada día y cada 4 días. Tras 2, 3 y 4 DIV para CMBOe, y tras 5, 6 y 7 DIV para CMBOa, las células fueron disgregadas, fijadas con etanol, teñidas con IP y analizadas por citometría de flujo. Los gráficos muestran el porcentaje de CMBOe y CMBOa en las fases G_0/G_1 (A y D), S (B y E) y G_2/M (C y F) en los distintos tiempos indicados. Los resultados son la media \pm SEM de 3-4 cultivos. DIV= días *in vitro*. IP = ioduro de propidio.

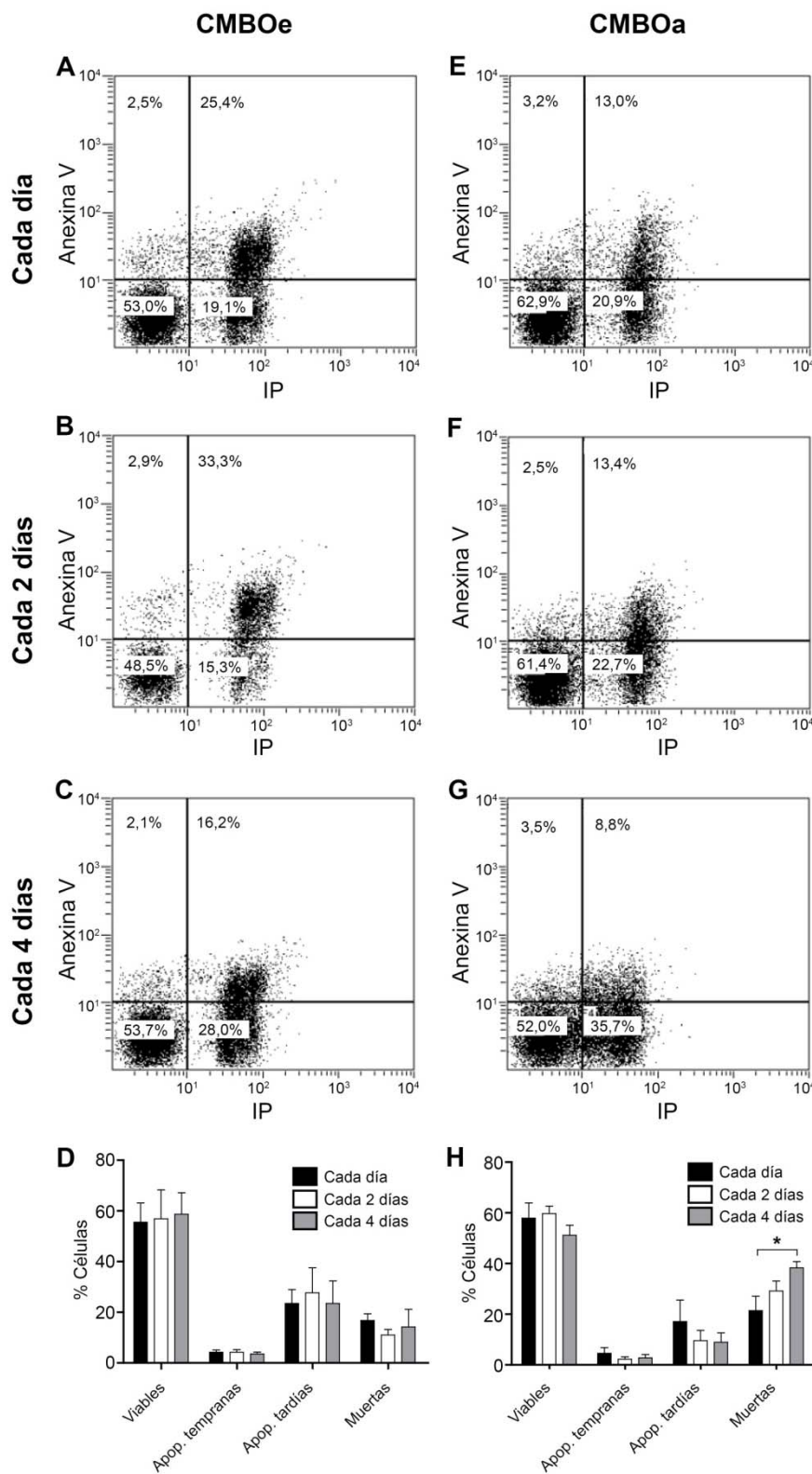


Figura 25: Aumento de la muerte celular en cultivos de CMBOa mantenidas con menor frecuencia de adición de FGF-2/EGF. CMBOe (A-D) y CMBOa (E-H) fueron crecidas como neurosféricas con adición de factores cada día, cada 2 días y cada 4 días. El 4º día en cultivos de CMBOe y el 7º día en cultivos de CMBOa, las neurosféricas fueron disgregadas mecánicamente, teñidas con IP y anexina V y analizadas por citometría de flujo. Los gráficos de puntos muestran el porcentaje de células viables, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y muertas en cultivos representativos de las distintas condiciones. En los gráficos de barras se representa el porcentaje de CMBOe (D) y CMBOa (H) en cada grupo de células. Los resultados son la media \pm SEM de 3-5 cultivos. * $P < 0,05$ (ANOVA de una vía seguida del análisis *post hoc* utilizando el test de Bonferroni). IP = Ioduro de propidio.

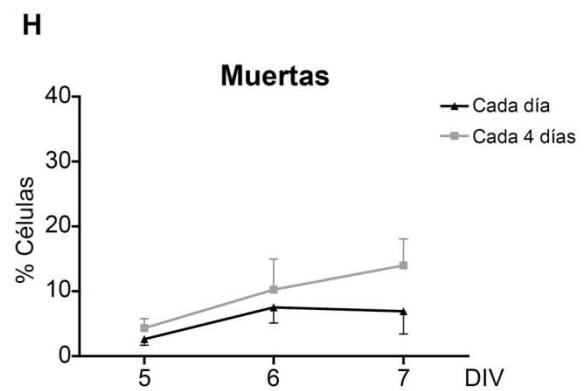
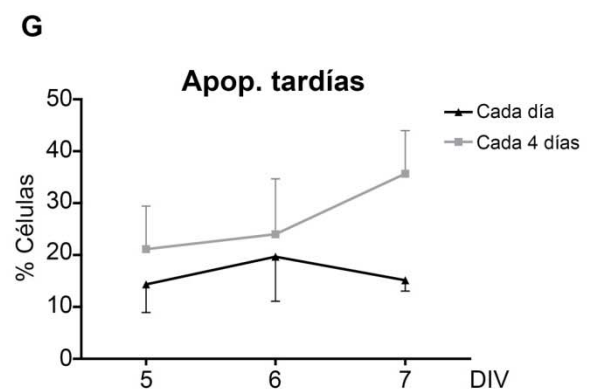
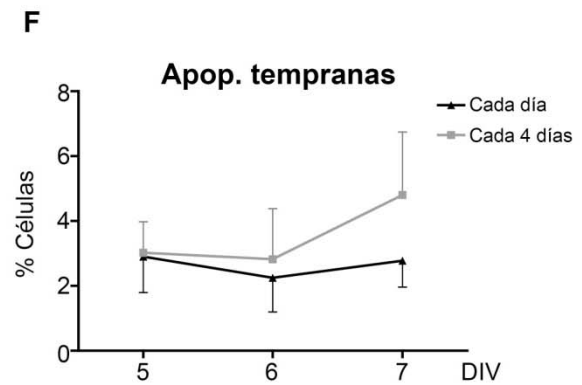
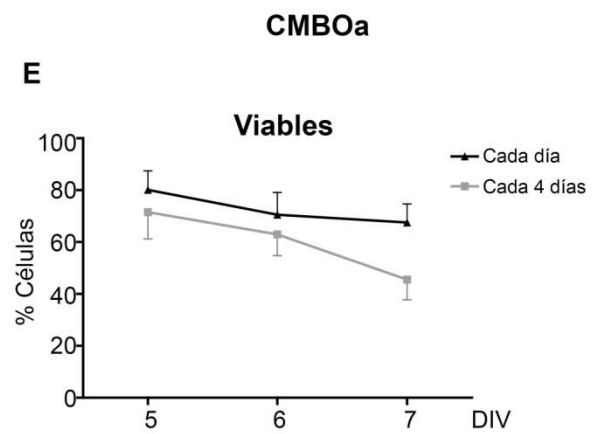
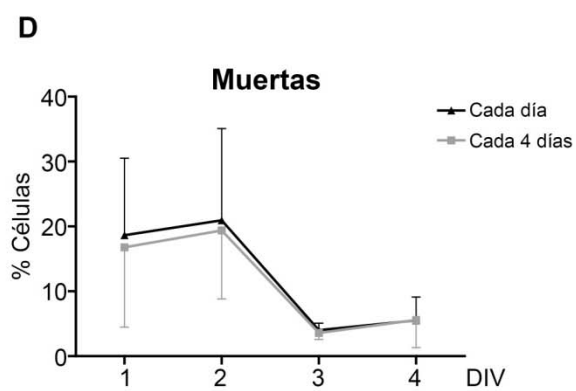
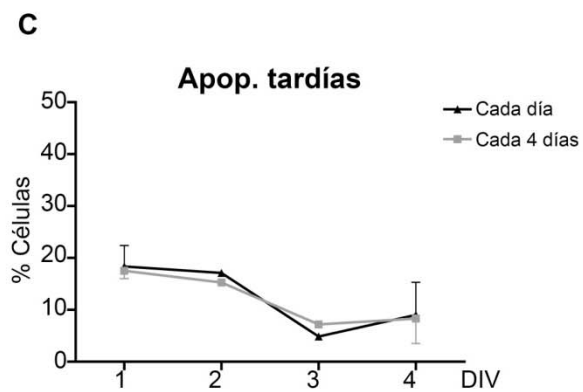
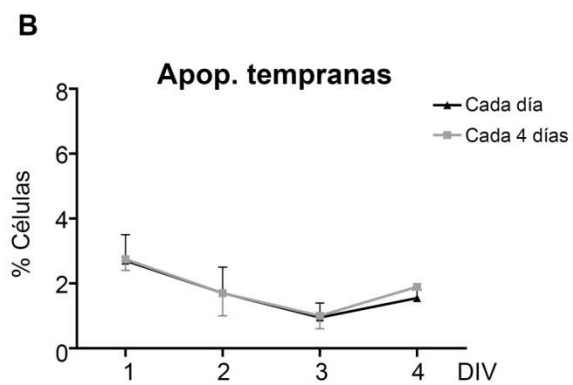
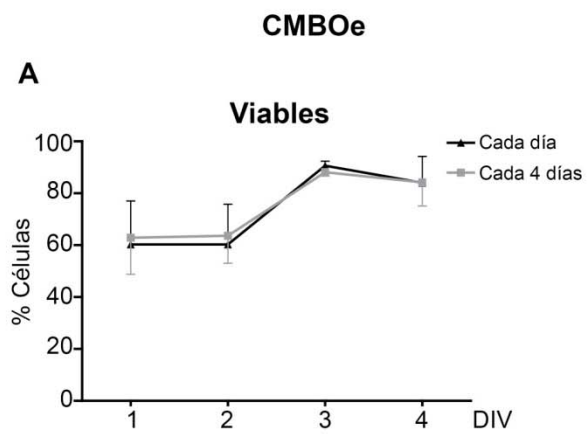


Figura 26: La menor adición de FGF-2/EGF aumenta progresivamente la muerte celular en cultivos de CMBOa. CMBOe (A-D) y CMBOa (E-H) fueron crecidas como neurosféricas con adición de factores cada día y cada 4 días. Tras 1, 2, 3 y 4 DIV para CMBOe, y tras 5, 6 y 7 DIV para CMBOa, las células fueron recogidas, teñidas con IP y anexina V y analizadas por citometría de flujo. Los gráficos muestran el porcentaje de CMBOe y CMBOa viables (A y E), apoptóticas tempranas (B y F), apoptóticas tardías (C y G) y muertas (D y H) en los distintos días en cultivo. Los resultados son la media \pm SEM de 2-4 cultivos. Las CMBOa presentaron una pérdida progresiva de la viabilidad celular en los cultivos de la condición 1d (del 80,13 % al 71,50 %), la cual se vio agravada por la menor adición de factores (del 88,75 % al 45,55 %; $P=0,08$ t de *Student* no pareado; $P<0,001$ t de *Student* pareado), así mismo, se observó un aumento de los porcentajes de células apoptóticas tempranas ($P=0,37$), tardías ($P=0,09$) y muertas ($P=0,26$ t de *Student* no pareado; $P<0,08$ t de *Student* pareado). DIV= días *in vitro*. IP = Ioduro de propidio.

1.2. Análisis de la multipotencialidad de las CMBO en análisis poblacional

A continuación, nos preguntamos si la falta parcial de los factores durante la fase de proliferación que denominamos “pretratamiento con FGF-2/EGF”, compromete la diferenciación de las CMBO a neuronas (TuJ1⁺), astrocitos (GFAP⁺) y oligodendrocitos (O4⁺). Para testar esa hipótesis, sembramos las CMBO, mantenidas durante la fase de proliferación con aporte de FGF-2/EGF diario, cada 2 o cada 4 días, en condiciones de diferenciación a corto plazo (3 días) y analizamos el porcentaje de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos en los distintos cultivos. No encontramos diferencias significativas en ninguno de los tres fenotipos neurales en cultivos de CMBOa, aunque el porcentaje de células TuJ1⁺ fue ligeramente menor en la condición 2d y 4d que en la condición 1d (20-24%; ANOVA, $P=0,3618$) (Fig. 27). El número total de células diferenciadas fue similar en todos los casos. Por el contrario, en los cultivos de CMBOe no se observó ninguna diferencia en ninguno de los tres marcajes analizados (Fig. 28). Estos resultados demuestran que la distinta frecuencia de adición de los factores FGF-2 y EGF durante la fase de proliferación no afecta significativamente la capacidad de diferenciación de las CMBO a los tres linajes neurales.

1.3. Mecanismos moleculares implicados de la supervivencia e inicio de la diferenciación de CMBO

1.3.1. Expresión de *Fgf-2*, *Egf* y sus receptores en CMBOa y CMBOe

En todos los parámetros estudiados (proliferación, muerte celular e inicio de la diferenciación), las CMBOa presentaron una mayor dependencia de FGF-2 y EGF. Por ello, nos planteamos, si dicho efecto podría ser debido a cambios en la expresión endógena de los factores de crecimiento y/o de sus receptores, de manera que analizamos la expresión de *Fgf-2*, sus receptores más abundantes en el cerebro (*Fgfr1*, *Fgfr2* y *Fgfr3*) (Guillemot y Zimmer 2011), *Egf* y *Egfr* (Yamada et al. 1997) por RT-qPCR en cultivos en proliferación de CMBOa y CMBOe mantenidos con aporte diario de factores y cada 4 días (Fig. 29). Las neurosféricas de CMBOe crecidas en la condición 1d, presentaron niveles más altos de *Fgfr1* (Fig. 29 B) que las CMBOa en la misma condición (t de *Student*, $P<0,01$). Por otro lado, la menor frecuencia de factores produjo un aumento de la expresión de *Fgf-2* en CMBOa (Fig. 29 A), y de *Fgfr1* (Fig. 29 B) y *Egf* (Fig. 29 E) en CMBOe comparado con la adición diaria. La expresión del resto de genes estudiados también experimentó un incremento cuando las CMBO eran sometidas a una adición de FGF-2/EGF cada 4 días respecto a la adición diaria, pero los cambios no resultaron estadísticamente significativos. Además, los niveles relativos de ARNm de *Fgf-2* fueron 20-155 veces más bajos que los de *Egf* (con similares eficiencias de

amplificación, próximas al 100%), sugiriendo que la vía de señalización de FGF-2 podría ser un proceso más limitante que la de EGF para la regulación de la supervivencia y mantenimiento de CMBO.

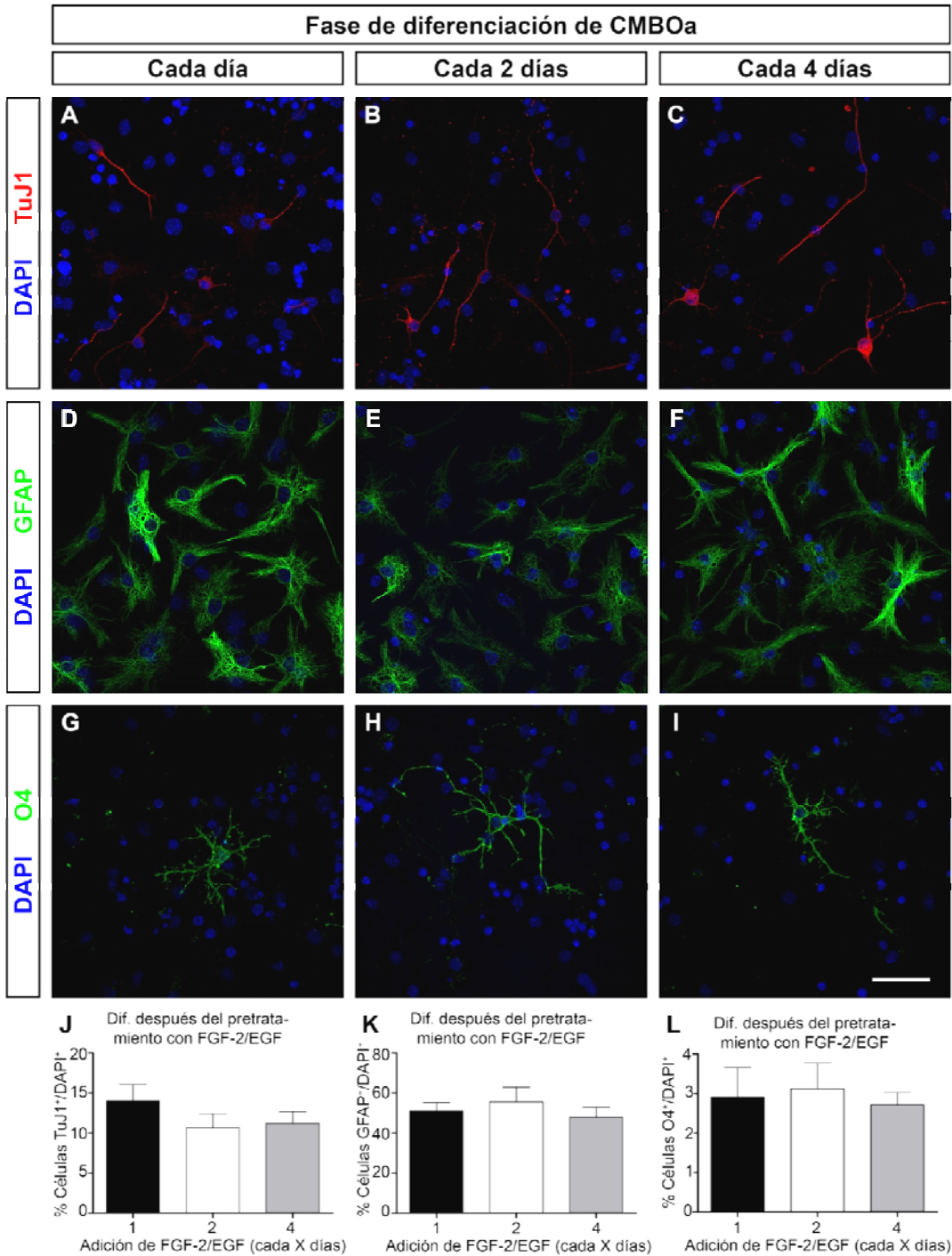


Figure 27: Diferenciación de las CMBOa pretratadas con FGF-2/EGF a distintos intervalos de frecuencia durante la fase de proliferación. Las CMBOa fueron mantenidas como neurosféricas en flotación con distintos intervalos de frecuencia de adición de FGF-2/EGF. Para inducir la diferenciación, las neurosféricas fueron disgregadas, sembradas a 100.000 células/cm² en cubreobjetos recubiertos con poliornitina y fibronectina y cultivadas durante 3 días en ausencia de FGF-2/EGF. Las células fueron fijadas e inmunoteñidas con anticuerpos específicos de células neurales y teñidas con DAPI. Las imágenes muestran campos representativos de células teñidas con anti-TuJ1 (A-C), anti-GFAP (D-F) y anti-O4 (G-I) en cada condición. Los gráficos indican los porcentajes de células TuJ1⁺ (J), GFAP⁺ (K) y O4⁺ (L) en cada grupo experimental. Los resultados representan la media ± SEM de 8 cultivos. Barra de escala (I) = 39,73 μm.

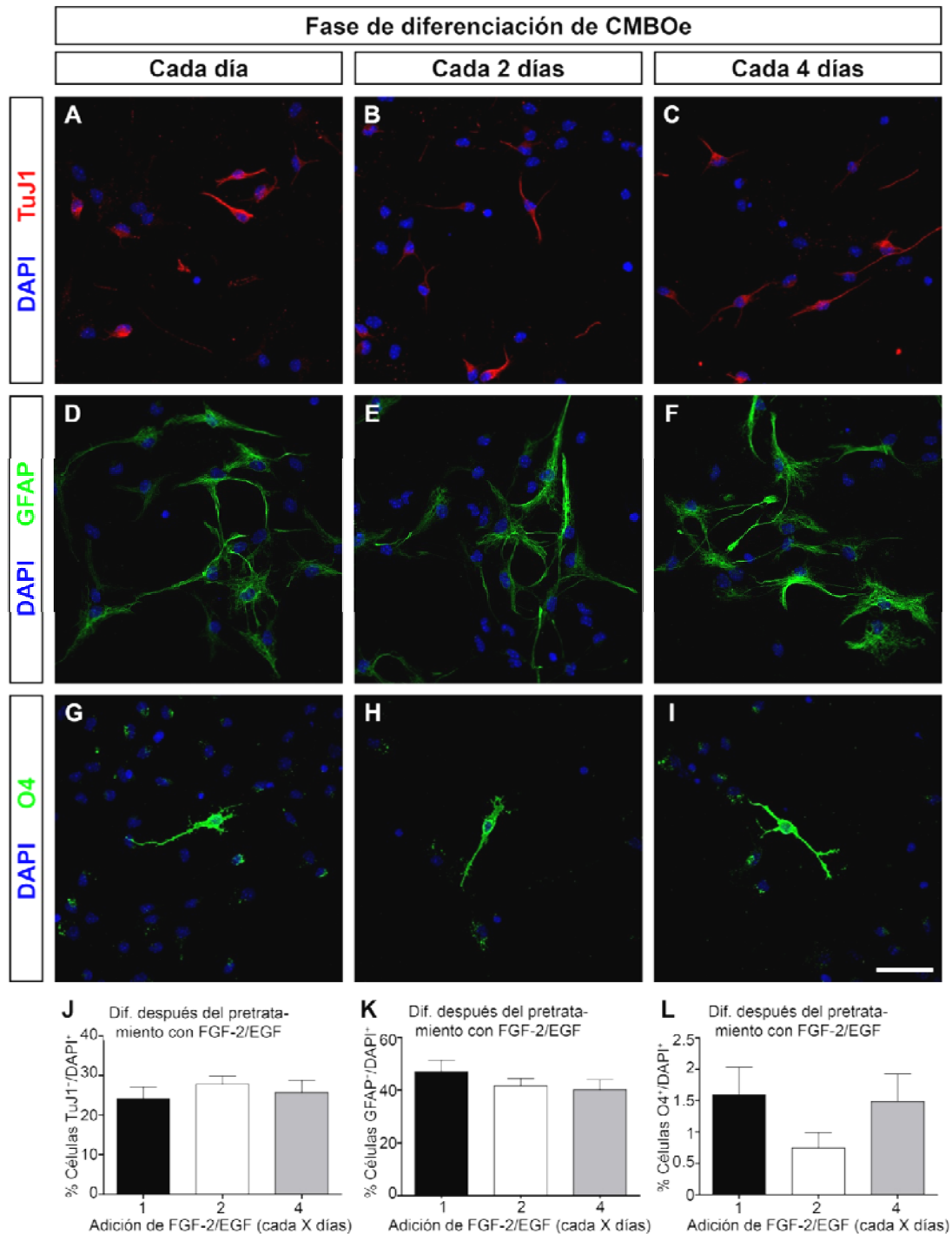


Figure 28: Diferenciación de las CMBOe pretratadas con FGF-2/EGF a distintos intervalos de frecuencia durante la fase de proliferación. Las CMBOe fueron mantenidas como neuroesferas en flotación con distintos intervalos de frecuencia de adición de FGF-2/EGF. Para inducir la diferenciación, las neuroesferas fueron disgregadas, sembradas a 100.000 células/cm² en cubreobjetos recubiertos con poliornitina y fibronectina y cultivadas durante 3 días en ausencia de factores. Las células fueron fijadas e inmunoteñidas con anticuerpos específicos y teñidas con DAPI. Las imágenes muestran campos representativos de células teñidas con anti-TuJ1 (A-C), anti-GFAP (D-F) y anti-O4 (G-I) en cada condición. Los gráficos indican los porcentajes de células TuJ1⁺ (J), GFAP⁺ (K) y O4⁺ (L) en cada grupo experimental. Los resultados representan la media \pm SEM de 8 cultivos. Barra de escala (I) = 39,73 μ m.

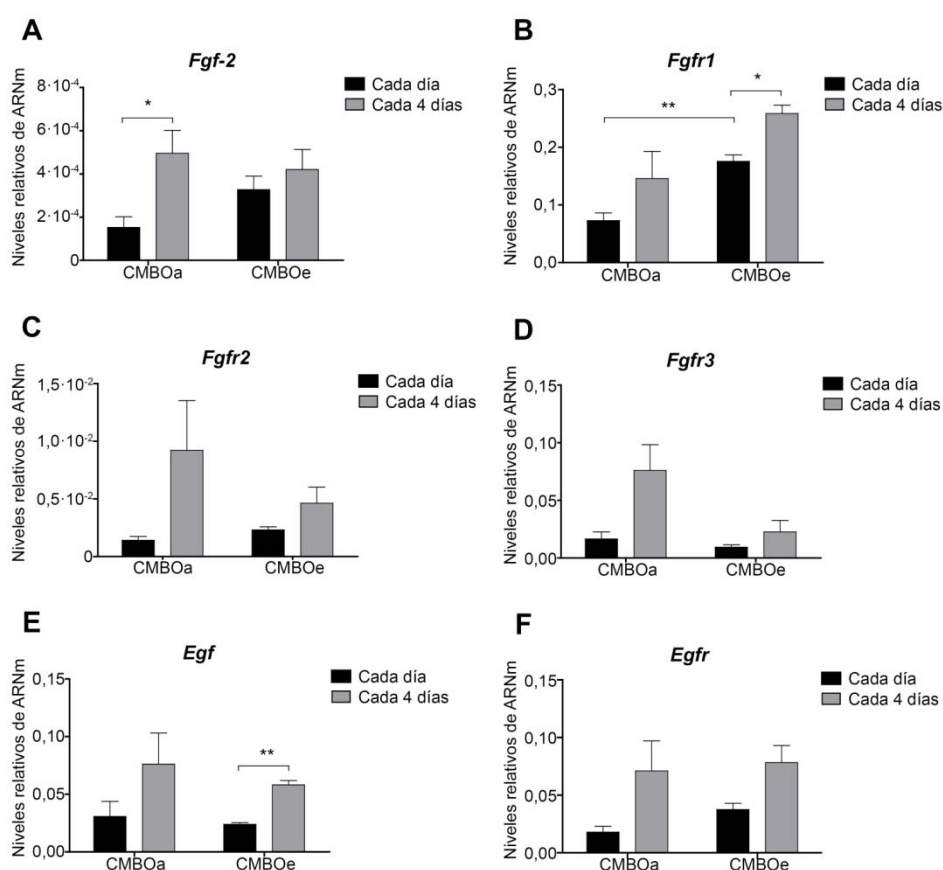


Figura 29: Expresión de *Fgf-2*, *Egf* y sus receptores en CMBO. Las CMBOa y CMBOe fueron crecidas como neurosféricas con adición de factores cada día y cada 4 días. El día del pase, las neurosféricas fueron disgregadas, se extrajo el ARNm y se analizaron los niveles relativos de expresión de varios genes utilizando RT-qPCR. Los gráficos muestran los niveles relativos de ARNm (normalizados frente a *Gadph*) de *Fgf-2* (A), *Fgfr1* (B), *Fgfr2* (C), *Fgfr3* (D), *Egf* (E) and *Egfr* (F). Los resultados son la media \pm SEM de 3 cultivos. *P < 0,05, **P < 0,01 (t de Student de dos colas).

1.3.2. Análisis global de la expresión génica

La menor supervivencia de las CMBOa y el incremento de la tendencia a diferenciarse en la fase de proliferación debido a la menor adición de FGF-2 y EGF, nos llevó a investigar los cambios en la expresión génica y las vías de señalización implicadas en dicho efecto. Por ello, realizamos un análisis global de los cambios de expresión génica en CMBOa crecidas en proliferación con adición de factores cada día, cada 2 días y cada 4 por micromatrices o *microarray* de Affimetrix. Este análisis se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Marcos J. Araúzo-Bravo (Laboratorio de Biología Computacional y Bioinformática, Departamento de Biología Celular y Desarrollo del Instituto Max Planck para Biomedicina Molecular, Múnich, Alemania). Encontramos una expresión diferencial en 38 genes en la condición 2d y 312 (180 sobre-expresados y 132 sub-expresados) en la 4d. Esta expresión diferencial de los genes en las 3 condiciones se puede observar en el mapa de intensidades o *heat map*, el cual muestra una gran similitud entre la muestra 1d y 2d, siendo 4d la que presentó mayores diferencias (Fig. 30 A). Además, estas diferencias fueron confirmadas en un análisis de jerarquía de

grupos (*hierarchical clustering analysis*) donde se encontró una mayor proximidad en las muestras 1d y 2d, siendo la 4d la más distante a las demás (Fig. 30 B). A continuación, representamos los niveles de expresión de cada uno de los genes (1d vs 2d y 1d vs 4d) en diagramas de dispersión, en los que además se muestran con puntos naranjas algunos genes clave (Fig. 30 C). En estos diagramas se puede observar que la muestra 4d poseía un mayor número de genes sobre o sub-expresados más de dos veces (puntos fuera de la franja azul) comparado con la muestra 1d. Además, la expresión de *Sox2* o *Pax6*, considerados marcadores de CMN y progenitores (Brill et al. 2008; Roybon et al. 2009; Vergaño-Vera et al. 2009; Han et al. 2012; Thier et al. 2012), no se ve alterada en ninguna de las condiciones. Sin embargo, otros genes entre los que destaca *Pla2g7* (del inglés *phospholipase A2 group VII, platelet-activating factor acetylhydrolase*), *Cryab* (del inglés *alpha B Crystallin*), *Ndr2* (del inglés *N-myc downstream regulated gene2*), *Dscam1* (del inglés *down syndrome cell adhesion molecule like*) y *Gpr17* (del inglés *G-protein-coupled receptor*) se encontraron sobre-expresados en 4d comparado en 1d.

Como la muestra 4d fue la que presentó más diferencias comparada con la condición 1d, decidimos analizar *in silico* la posible función de los genes cuya expresión resultó alterada. En primer lugar, se realizó un análisis de ontologías génicas (*gene ontology category*, GO) mediante el cual se clasificaron los genes según el *proceso biológico*, el *componente celular* y la *función molecular* al que afectan. En los gráficos circulares se muestran las categorías ontológicas y su abundancia de los genes asociados a cada una de las clasificaciones (Fig. 30 D). Destacamos que, según el *proceso biológico* que realizan, los genes cuya expresión se vio alterada por la ausencia parcial de FGF-2/EGF estaban relacionados, principalmente, con “la regulación de procesos celulares, biológicos y metabólicos”, así como con la “respuesta a estímulos”, “desarrollo” y “transporte”.

A continuación se realizó un análisis para comprobar qué categorías o términos de GO resultaban estadísticamente significativas (*Gene ontology enrichment analysis*). Todas las categorías encontradas en el estudio y los genes incluidos en cada una de ellas se muestran en las tablas 39 (proceso biológico), 40 (componente celular) y 41 (función molecular). En la Figura 31, se representan todas las categorías, basándonos en el proceso biológico que afectan, que resultaron significativas en el análisis y los principales genes incluidos en cada una de ellas. En este análisis encontramos 10 categorías GO expresadas diferencialmente en la condición 4d comparado con 1d (ver tabla 39). Entre los genes sobre-expresados en la condición 4d encontramos *Cryab*, *Dscam1*, *Ndr2* y *Gpr17*, entre otros. Estos genes han sido relacionados con procesos de muerte celular y supervivencia (*Cryab*) (Masilamoni et al. 2006; Ousman et al. 2007; Bousette et al. 2010), adhesión celular y diferenciación neuronal (*Dscam1*) (Agarwala et al. 2001; McIntyre et al. 2010), transducción de señales y diferenciación neuronal y glial (*Gpr17*, *Ndr2*) (Lecca et al. 2008; Okuda et al. 2008; Chen et al. 2009; Ceruti et al. 2011; Li et al. 2011; Liu et al. 2012; Ren et al. 2012). También, encontramos incrementados los niveles de *S100b* (una proteína de unión a calcio) y *Fgfr3*, ambos genes implicados en el linaje astrocítico. Por otro lado, encontramos genes sub-expresados como *Spry4* y *Adm* que podrían ser importantes en el control de la proliferación celular y señalización mediada por FGF-2 (Vergaño-Vera et al. 2010; Guillemot y Zimmer 2011; Lai et al. 2011; Larrayoz et al. 2012). *Calb 1* (calbindina), que está involucrada en la supervivencia y la diferenciación neuronal en respuesta a

neurotrofinas y FGF-2, es otro de los genes sub-expresados en la condición 4d (Vicario-Abejón et al. 1995; Pappas y Parnavelas 1997; Shetty et al. 2004; Schmidt 2012).

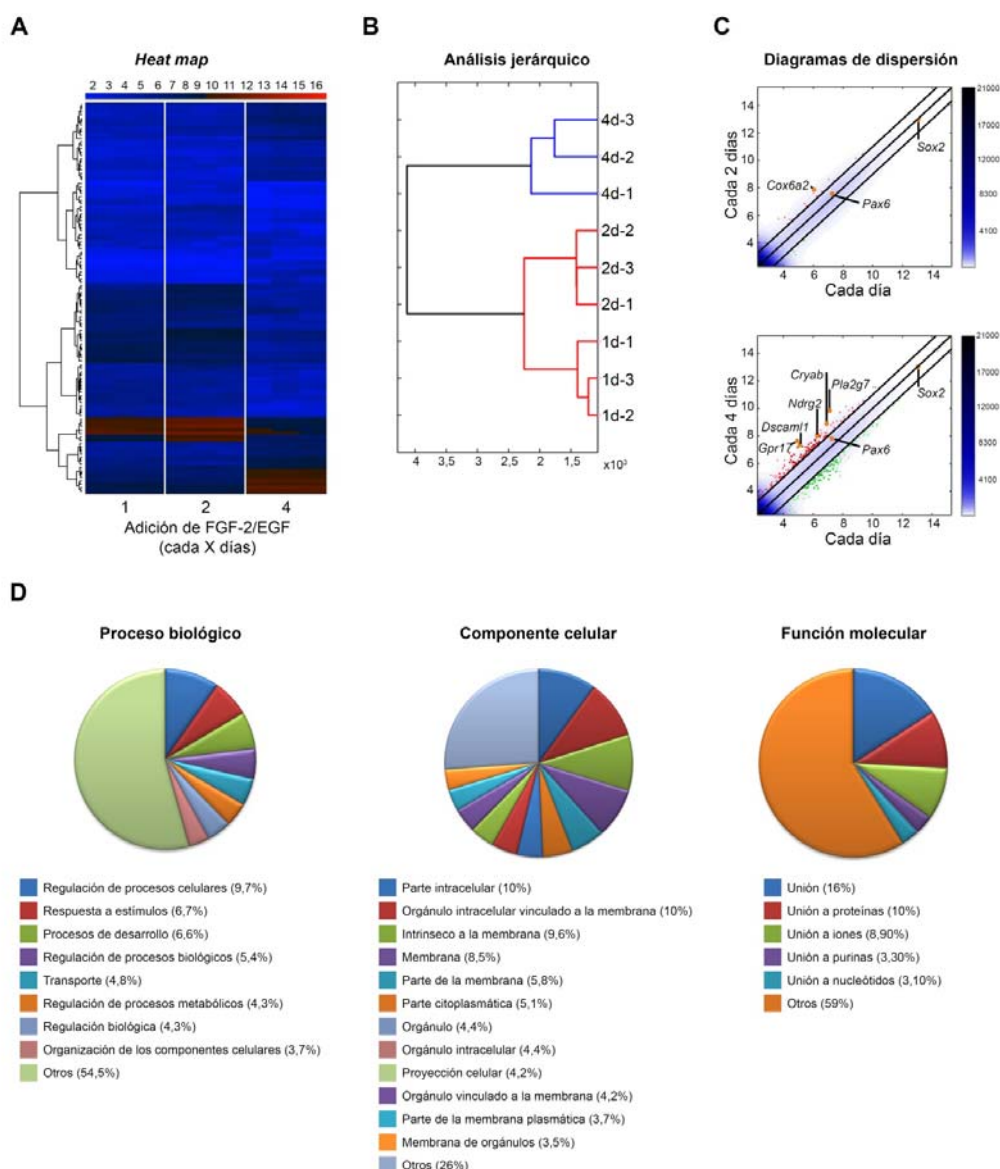


Figura 30: Análisis global de la expresión génica de CMBOa cultivadas con distintos intervalos de adición de FGF-2/EGF. Las CMBOa fueron crecidas como neurosféricas con adición de factores cada día, cada 2 días y cada 4 días, se extrajo el ARNm y se analizaron los niveles relativos de expresión génica mediante *microarray*. **(A)** El *heat map* representa los niveles de expresión de genes cuya variación entre la muestra 1d y las muestra 2d o 4d fue mayor de 2 veces (escala \log_2) y tuvieron un $FDR < 0,01$. Según se incrementa la variación entre los niveles de expresión, el color va cambiando de manera gradual de azul a rojo (ver la escala de color de la parte superior), de manera que los genes que mostraron menor variación se marcan en azul. **(B)** El gráfico muestra el análisis jerárquico que se realizó utilizando el método de pares agrupados usando el promedio aritmético para estudiar el grado de similitud entre las muestras 1d, 2d y 4d. **(C)** Los diagramas de dispersión muestran los niveles relativos de expresión de la muestra 2d (superior) y 4d (inferior) comparado con la muestra 1d. Las líneas negras delimitan la zona en la que se incluyen aquellos genes cuyos niveles de variación de expresión se encuentra entre -2 y 2 (escala \log_2). En rojo se marcan los genes sobreexpresados más de dos veces y en verde los subexpresados más de dos veces. Con puntos naranjas se resaltan algunos marcadores de CMN (*Sox2* y *Pax6*) y genes de interés (*Cox6a2*, *Pla2g7*, *Cryab*, *Ndr2*, *Dscaml1* y *Gpr17*). **(D)** Los diagramas circulares muestran la distribución de los genes en las distintas categorías ontológicas en función del proceso biológico, el componente celular afectado, o la función molecular en la que participan.

Tabla 39: Proceso Biológico

Categoría de GO	GO	P	Gen
Transducción de señales	GO:0007165	1,116e-03	Abca1 Adcyap1r1 Adm Anxa1 Araf Arhgap29 Cd93 Crlf1 Cryab Cxcr7 Dcc Diras2 EphA5 Fgfr3 Gabbr1 Gfra2 Gpr155 Gpr17 Gpr371l Grin3a Grm3 Hmga2 Igf2r Itga4 Itga8 Itgb5 Lpar4 Lphn3 Mmd2 Ndrgr2 Nupr1 P2rx3 Paqr4 Pcdha1 Pde1b Pde2a Pdk1 Pex11a Plxn1 Plxnb1 Plxnb3 Ppp1r1a Ppp2r2b Ptprd Pvr Ramp1 Rapgef4 Rassf2 Ryr3 Scara5 Smoc1 Sparcl1 Srgap3 Tlr4 Tnfrsf19 Tnr Vldlr Wnk1
Regulación de procesos celulares	GO:0050794	9,306e-03	2610109H07Rik 2900075N08Rik Abca1 Acs14 Adcyap1r1 Adm Anxa1 Araf Arhgap29 Asns Atf4 Bcat1 Bcl2l1 Btg1 Calb1 Cd93 Cnpe Clic5 Crlf1 Cryab Cth Cxcr7 D0H4S114 Dcc Diras2 Dll1 Dll3 Dscam Dscaml1 Ebf3 Ecm1 Ell2 EphA5 Fam5c Fbln2 Fgfr3 Gabbr1 Gfra2 Gpr155 Gpr17 Gpr371l Grin3a Grm3 Gtpbp4 Hepacam Hes5 Hmga2 Homer2 Id3 Id4 Igf2r Itga4 Itga8 Itgb5 Kcnj10 Lmo3 Lpar4 Lphn3 Lrrc4c Meis2 Mfge8 Mia3 Mmd2 Mycl1 Ndrgr2 Nol3 Npnt Nupr1 Omg P2rx3 Paqr4 Pcdha1 Pde1b Pde2a Pdk1 Pex11a Plxn1 Plxnb3 Ppap2b Ppp1r14b Ppp1r1a Ppp2r2b Prdx4 Prkcq Prrx1 Ptprd Pvr Rad21 Ramp1 Rapgef4 Rassf2 Rgma Rnf128 Ryr3 S100b Scara5 Shmt2 Shroom2 Smoc1 Sncaip Sox21 Sparcl1 Spp1 Spry4 Srgap3 Timp1 Timp3 Tlr4 Tnfrsf19 Tnfsf9 Tnr Trib3 Vcam1 Vldlr Wnk1 Zcchc12
Adhesión celular	GO:0007155	1,432e-02	2900075N08Rik Alcam Cd93 Cdh11 Col12a1 Dscam Dscaml1 Ezr Hepacam Hes5 Itga4 Itga8 Itgb5 Mfge8 Npnt Omg Pcdha1 Podxl2 Pvr Sned1 Spp1 Tnr Ttyh1 Vcam1
Muerte celular	GO:0008219	1,524e-02	1810011O10Rik Bcl2l1 Chac1 Cryab Dcc Mmd2 Ppp2r2b Rad21 Tmem173 Trib3
Procesos metabólicos de la glucosa	GO:0006006	2,177e-02	Atf4 Cryab Fbp1 Gbe1 Hk2 Pck2 Pdk1 Pfkp Ppp1r1a
Regulación de la organización de proyecciones celulares	GO:0031344	3,117e-02	Dcc Dscam Lrrc4c Omg Plxn1 Prkcq Rapgef4 Spp1
Morfogénesis de componentes celulares	GO:0032989	3,124e-02	Adm D0H4S114 Dcc Dcll1 Dscam Nrn1 Omg Shroom2
Morfogénesis embrionaria	GO:0048598	3,131e-02	Adm Dll1 Dscaml1 Itga8 Ppap2b Prrx1 Rgma Vcam1
Regulación de la actividad catalítica	GO:0050790	4,061e-02	Adcyap1r1 Als2cl Anxa1 Arhgap29 Bcl2l1 Btg1 Cnpe Cryab Ecm1 Gabbr1 Grm3 Gtpbp4 Ppp1r14b Ppp1r1a Ppp2r2b Rap1gap Rapgef4 Serpina3n Serpinb8 Spry4 Srgap3 Timp1 Timp3 Tlr4 Trib3 Vldlr Wnk1
Desarrollo de sistemas	GO:0048731	4,182e-02	Dcll1 Dll1 Dll3 Dscam Dscaml1 E130309F12Rik Fam5c Gfra2 Hes5 Id3 Itga8 Ndrgr2 Nrn1 Slc5a3 Slc7a5 Timp3

Tabla 40: Componente celular

Categoría de GO	GO	P	Gen
Proyecciones celulares	GO:0042995	8,517e-03	Adcyap1r1 Alcam Anks1b Anxa1 Atp1a2 Cadm2 Clic5 Cplx2 Dcc Dscam Ezr Gabbr1 Grin3a Grm3 Ipww Kcnj10 Khlh24 P2rx3 Plekhh1 Rapgef4 Shroom2 Slc6a11 Spp1 Ttyh1 Vcam1
Matriz extracelular proteica	GO:0005578	1,768e-02	Col12a1 Ecm1 Fbln2 Hpse Mamdc2 Npnt Smoc1 Sparcl1 Timp1 Timp3 Tnr
Citosol	GO:0005829	3,021e-02	Araf Bcat1 Bcl2l1 Calb1 Chac1 Cplx2 Cryab Ezr Fbp1 Pfkp Ppp2r2b Rapgef4 Scsep1 Serpinb8 Slc7a5

Tabla 41: Función molecular

Categoría de GO	GO	P	Gen
Unión a lípidos	GO:0008289	1,689e-02	Anxa1 Anxa4 Calb1 Hsd1l2 Igf2r Lpar4 Mfge8 Mgl1 Syt16 Tnr
Unión a complejos proteicos	GO:0032403	1,707e-02	Aldh1l1 Itgb5 LOC100505062 Mfge8 Npnt Pdk1 Ppp2r2b Rapgef4 Tnr Vcam1
Actividad de receptores acoplados a proteínas G	GO:0004930	2,421e-02	Adcyap1r1 Cxcr7 Gabbr1 Gpr17 Gpr371l Grm3 Igf2r Lpar4 Lphn3
Actividad de transducción de señales	GO:0004871	2,721e-02	Abca1 Adcyap1r1 Araf Cd93 Crlf1 Cxcr7 Dcc EphA5 Fgfr3 Gabbr1 Gfra2 Gpr155 Gpr17 Gpr371l Grin3a Grm3 Igf2r Itga4 Itga8 Itgb5 Lpar4 Lphn3 Mmd2 P2rx3 Paqr4 Pcdha1 Pdk1 Plxn1 Plxnb3 Ptprd Pvr Ramp1 Ryr3 Scara5 Tlr4 Tnfrsf19 Vldlr
Unión a iones de calcio	GO:0005509	3,838e-02	Anxa1 Anxa4 Calb1 Caps2 Cd93 Cdh11 Dll1 Fbln2 Myl9 Npnt Pcdha1 Ryr3 S100b Smoc1 Sned1 Sparcl1 Vldlr



Figura 31: Análisis de ontologías de muestras de CMBOa cultivadas con distintos intervalos de adición de FGF-2/EGF. Las CMBOa fueron crecidas como neuroesferas con adición de factores cada día y cada 4 días, se extrajo el ARNm y se analizaron los niveles relativos de expresión mediante *microarray*. Posteriormente, se realizó un análisis de ontologías genéticas de todos los genes que presentaron una variación de más de dos veces, resultando 10 categorías de GO estadísticamente significativas. En cada categoría se indican en rojo los genes sobreexpresados y en azul los genes subexpresados.

Cuando el análisis de ontologías lo realizamos sólo con los genes sobre-expresados en la condición 4d en comparación con 1d, encontramos otra categoría significativa, “procesos del catabolismo de lípidos”, en la que está incluido un gen altamente sobre-expresado, *Pla2g7*, involucrado en la ruptura de los productos tóxicos de fosfolípidos oxidados (Fig. 32 A) (Chen et al. 2007; Demos et al. 2008). Por otro lado, si sólo tenemos en cuenta los genes sub-expresados para realizar el análisis, encontramos los genes *Spry4* y *Adm* dentro de las categorías “regulación de la actividad quinasa” y “respuesta a estímulos de péptidos hormonales”, involucrados en proliferación celular como se ha mencionado en el párrafo anterior (Fig. 32 B) (Lai et al. 2011; Larrayoz et al. 2012).

Para validar los datos obtenidos por *microarray*, analizamos por RT-qPCR los niveles relativos de ARNm de varios genes asociados con las distintas categorías alteradas y/o cuya expresión estuviera afectada en más de dos veces en el *microarray*. En primer lugar, observamos una gran correlación de los datos obtenidos por *microarray* y los datos de RT-qPCR (coeficiente de determinación, $R^2=0,8477$) (Fig. 33) y verificamos que los niveles de los genes *Dscaml1*, *Gpr17*, *Pla2g7*, *Cryab*, *S100b* y *Ndr2* estaban aumentados de 1-5 veces (en escala \log_2) en las CMBOa 4d comparados con la muestra 1d. Además, los genes *Gpr17*, *Pla2g7*, *Calb1* y *IGFBP3* también estaban

sobre-expresados en la condición 2d comparado con los niveles en 1d. Finalmente, se encontraron sub-expresados los genes *Npnt* y *Calb1* en la condición 4d (Fig. 33 C).

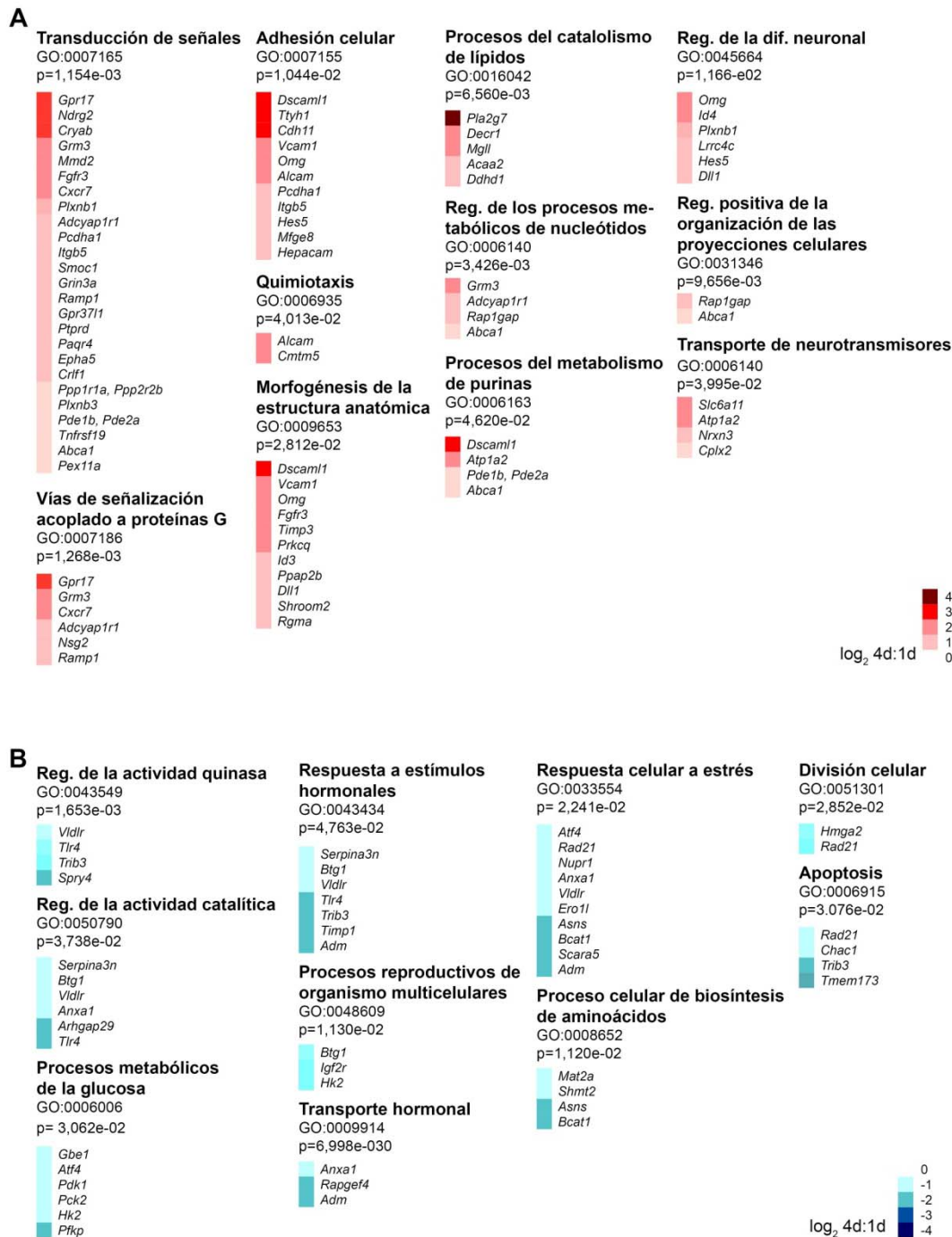


Figura 32: Análisis de ontologías de genes sobre y subexpresados en muestras de CMBOa cultivadas con distintos intervalos de adición de FGF-2/EGF. Las CMBOa fueron crecidas como neurosféricas con adición de factores cada día y cada 4 días, se extrajo el ARNm, se analizaron los niveles relativos de expresión génica mediante *microarray* y se realizó un análisis de ontologías genéticas de los genes sobreexpresados (A) o subexpresados (B) en las muestras 4d comparados con las muestras 1d.

El análisis de la expresión de estos genes por RT-qPCR también se realizó en muestras de CMBOe. A pesar de que los efectos en la proliferación y muerte en CMBOe producidos por la falta de FGF-2 y EGF no resultaron tan prominentes como en CMBOa, los genes *Dscam1*, *Gpr17*, *Pla2g7* y *Ndgr2* se hallaron sobre-expresados (entre 1-4 veces) en las condiciones 2d y 4d comparado con la control (Fig. 33 D).

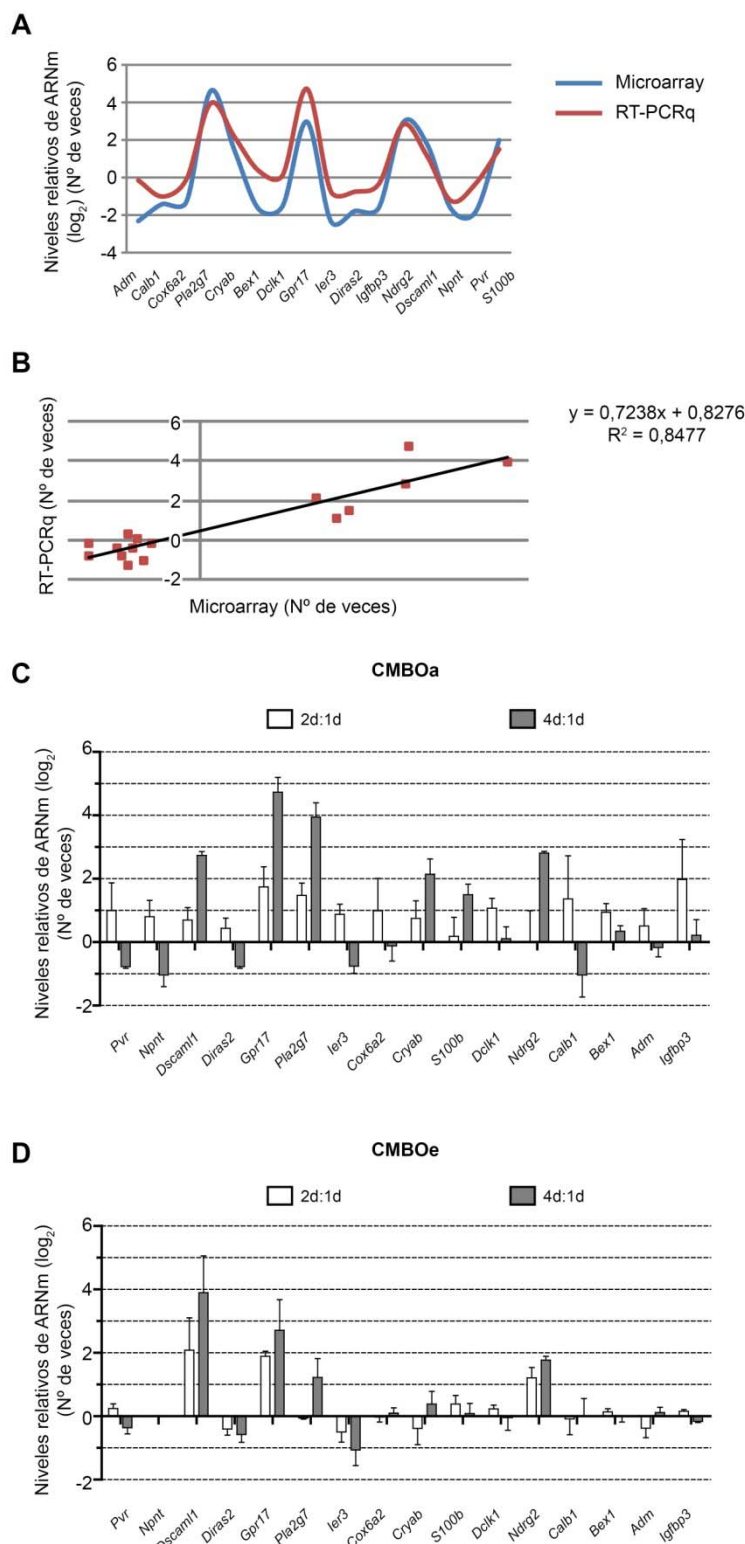


Figura 33: Análisis de la expresión génica de muestras de CMBOa y CMBOe por RT-qPCR y su comparación con los resultados obtenidos mediante *microarray*. (A) La grafica muestra los cambios de expresión en los distintos genes obtenidos por *microarray* (azul) y por RT-qPCR (rojo). (B) La gráfica indica la alta correlación (coeficiente de determinación, $R^2 = 0,8477$) existente entre los datos obtenidos por *microarray* y por RT-qPCR de muestras de CMBOa mantenidas con adición de factores cada día y cada 4 días. (C) En la gráfica se representan los niveles de expresión validados por RT-qPCR de algunos genes que resultaron sobre o subexpresados dos veces o más (escala log₂) en el *microarray* en muestras de CMBOa. (D) La gráfica muestra los niveles de expresión de genes obtenidos a partir de muestras de CMBOe por RT-qPCR. Los resultados son la media \pm SEM de 3 cultivos.

Por último, realizamos un estudio de las vías de señalización bioquímica, basándonos en la *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG). Este análisis mostró dos vías de señalización afectadas por la disminución en la frecuencia de adición de FGF-2 y EGF, “guía axonal” e “interacción entre receptor y ligandos neuroactivos” (Fig. 34). La vía de “guía axonal” incluye los genes *Dcc*, *Plxnb1* y *EphA* implicados en la diferenciación neuronal y en particular, en la regulación del crecimiento y repulsión del axón (McIntyre et al. 2010; Gao et al. 2012), y *Grm3* y *Grin3a* relacionados con la señalización metabotrópica del glutamato (Andersson et al. 2001; Lyon et al. 2008).

En conjunto, nuestros resultados obtenidos tras el análisis transcripcional global muestran que la reducción de la frecuencia de adición de FGF-2 y EGF en cultivos de CMBO desencadena cambios significativos en la expresión de genes involucrados en la muerte, protección y diferenciación celular.

2. Papel de BDNF y NT-3 en la maduración morfológica y sináptica de neuronas derivadas de CMBOe

Una vez estudiadas las señales moleculares que mantienen la supervivencia e indiferenciación de las CMBO, quisimos explorar la capacidad y los mecanismos celulares de diferenciación de estas células en neuronas maduras.

Las neurotrofinas, BDNF y NT-3, promueven la maduración neuronal y la formación de sinapsis en determinadas regiones durante el desarrollo del SN. En cultivos primarios de neuronas hipocámpales o en neuronas derivadas de CMHP, se ha demostrado que BDNF y NT-3 estimulan la formación de sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas (Vicario-Abejón et al. 1995; Vicario-Abejón et al. 1998; Vicario-Abejón et al. 2000). En el sistema olfatorio también se ha propuesto que BDNF regula la maduración neuronal, afectando al desarrollo dendrítico y axonal en las NOS y en neuronas derivadas de CMBOe (Vergaño-Vera et al. 2006; Cao et al. 2007). Además, se ha demostrado que BDNF es necesario para el desarrollo dendrítico de determinados tipos neuronales del BO como las neuronas parvoalbúmina⁺, mitrales y empenachadas (Berghuis et al. 2006; Imamura y Greer 2009). Por el contrario, en la ZSV hay trabajos que describen que BDNF favorece la incorporación de neuronas en el BO, mientras que otros autores no observan dicho efecto (Benraiss et al. 2001; Galvão et al. 2008). Por ello, nos propusimos profundizar en el efecto de BDNF y NT-3 durante la maduración morfológica y la sinaptogénesis de neuronas derivadas de CMBOe. Elegimos esta población celular ya que nos permite obtener (más fácilmente que las CMBOa) distintos subtipos neuronales presentes en el BO y estudiar, en detalle, cómo las neurotrofinas influyen en su maduración morfológica y sináptica.

2.1. Expresión de TrkB y TrkC en el BO embrionario

En primer lugar analizamos la expresión de los receptores de las neurotrofinas durante el desarrollo del BO y en neuronas derivadas de CMBOe en cultivo. Para lo cual, teñimos secciones de ratones E14,5 y neuronas cultivadas durante 14 días con anticuerpos contra TrkB (receptor de BDNF y de NT-3, aunque con menor afinidad para la segunda) y TrkC (receptor de NT-3) (Fig. 35) (Vicario-Abejón et al. 1998; Park y Poo 2013). Encontramos que la expresión de ambos receptores es

aparentemente abundante en el BO durante el desarrollo embrionario, detectándose ampliamente distribuidos por todas las capas del BO (Fig. 35 A-B). La expresión de TrkB se detectó mayoritariamente en la CCM, aunque también había una expresión más baja en la ZSV/ZV y en la ZI. La expresión de TrkC se encuentra además en la zona donde se inicia la formación de los glomérulos. En cultivos de CMBOe, encontramos que un 64,29 % de las neuronas MAP2ab⁺ fueron positivas para TrkB y un 54,55% para TrkC tras 14 días en diferenciación (Fig. 35 C-E).

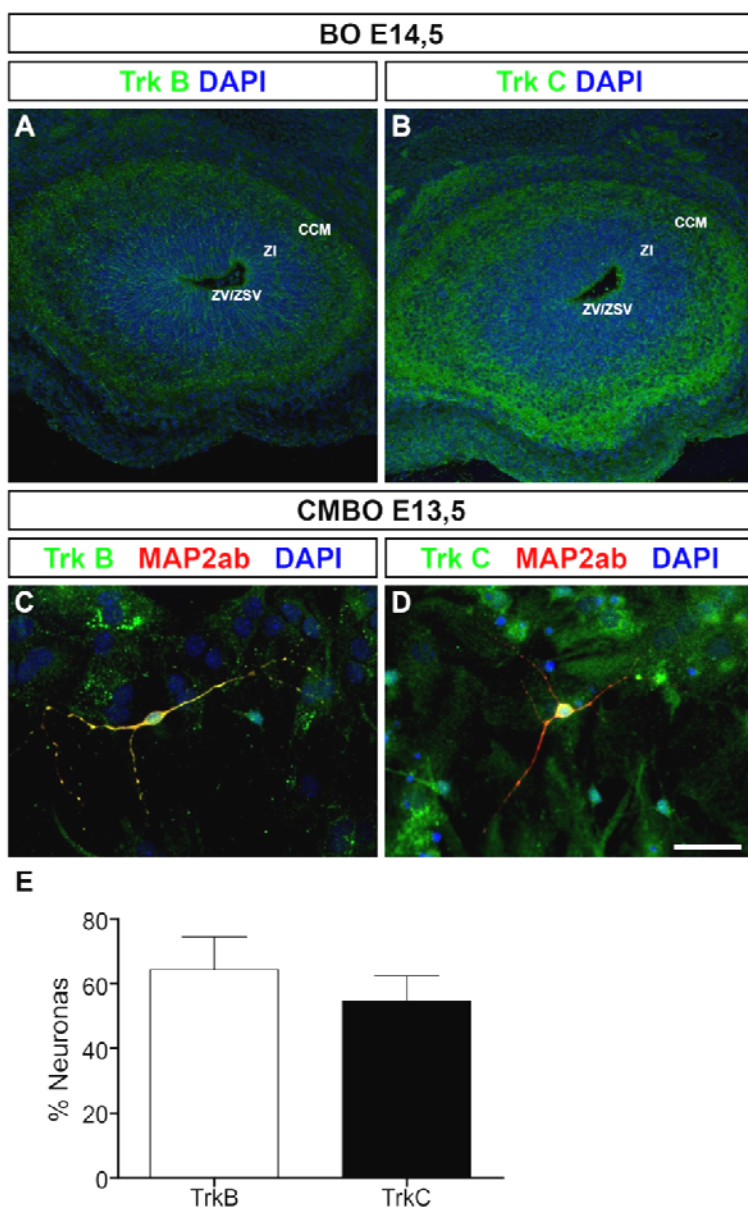


Figura 35: Expresión de TrkB y TrkC en secciones de BO y en neuronas derivadas de CMBOe.

En A y en B se muestran imágenes de secciones de BO obtenidas de embriones E14,5, inmunoteñidas con anticuerpos contra TrkB (A) y TrkC (B) y teñidas con DAPI. En C y D se presentan imágenes de cultivos de neuronas (MAP2ab⁺) derivadas de CMBOe, inmunoteñidas con anti-TrkB (C) y anti-TrkC (D) y teñidas con DAPI. El gráfico en E indica el porcentaje de neuronas MAP2ab⁺ que expresaron TrkB o TrkC. Los resultados se indican como la media \pm SEM de 4 cultivos. CCM = Capa de células mitrales; ZI = Zona intermedia; ZV/ZSV = Zona ventricular/zona subventricular. Barra de escala (D) = A-B, 114,29 μ m; C-D, 37,27 μ m.

2.2. Efecto de BDNF y NT-3 en la maduración de neuronas derivadas de CMBOe

Una vez comprobado que TrkB y TrkC se expresan en el BO y en neuronas derivadas de CMBOe, quisimos determinar si las neurotrofinas podrían regular la maduración neuronal y el establecimiento de las sinapsis, por lo que nos planteamos estudiar el efecto de BDNF y NT-3 en distintos subtipos neuronales del BO durante su maduración en cultivo.

2.2.1. Neuronas GABAérgicas

Las principales interneuronas en el BO son las células GABAérgicas (Vergaño-Vera et al. 2006). Por ello, analizamos el efecto de BDNF y NT-3 en la maduración de neuronas de ese tipo generadas a partir de CMBOe a los 14 días en cultivo (Fig. 36) y a los 21 días (Fig. 37) utilizando anticuerpos contra MAP2ab y GABA.

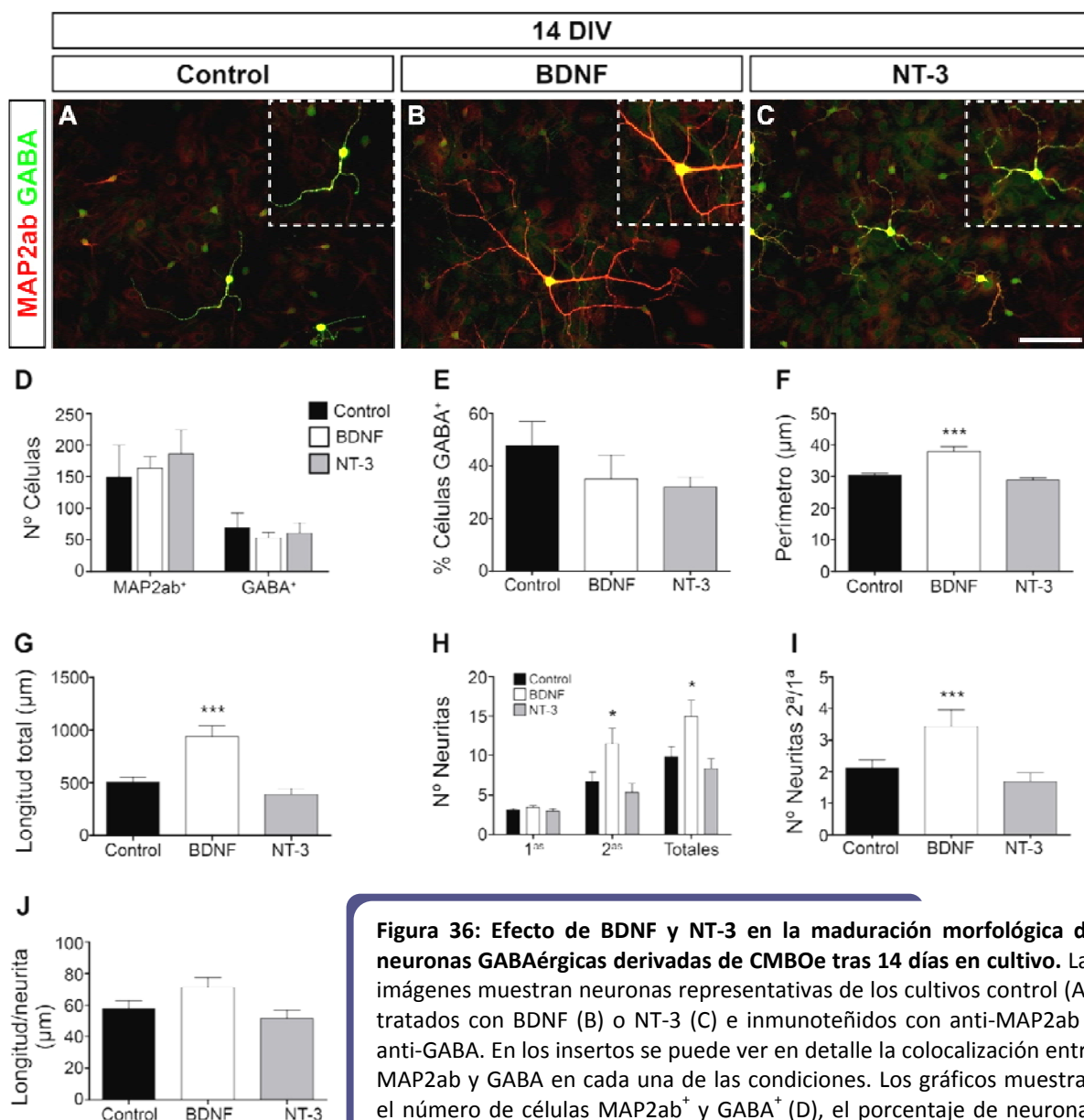


Figura 36: Efecto de BDNF y NT-3 en la maduración morfológica de neuronas GABAérgicas derivadas de CMBOe tras 14 días en cultivo. Las imágenes muestran neuronas representativas de los cultivos control (A), tratados con BDNF (B) o NT-3 (C) e inmunoteñidos con anti-MAP2ab y anti-GABA. En los insertos se puede ver en detalle la colocalización entre MAP2ab y GABA en cada una de las condiciones. Los gráficos muestran el número de células MAP2ab⁺ y GABA⁺ (D), el porcentaje de neuronas GABA⁺ (E), el perímetro neuronal (F), la longitud total de las neuritas (G), el número de neuritas primarias, secundarias y totales (H), número de neuritas 2^a por neurita 1^a (I) y la longitud por neurita (J) en las tres condiciones. Los resultados son la media \pm SEM de 3-4 cultivos por condición para el número de células MAP2ab⁺ y GABA⁺ y el porcentaje de neuronas GABA⁺. El análisis morfológico se realizó en 20-30 neuronas GABA⁺. *P < 0,05 y ***P < 0,001 (t de Student). Barra de escala (C) = 74,6 µm; insertos 20 µm.

A los 14 días en cultivo, los números totales de neuronas MAP2ab⁺ y GABA⁺ no se vieron afectados en ninguna de las condiciones estudiadas (Fig. 36 D), aunque se observó una ligera disminución no significativa en los porcentajes de neuronas GABA⁺ en los cultivos tratados con BDNF (20 ng/ml) y NT-3 (20 ng/ml) comparados con los controles (47,67%, 35,07% y 31,97%: control, BDNF y NT-3, respectivamente; Fig. 36 E). Sin embargo, las neuronas de los cultivos tratados con BDNF eran de mayor tamaño, reflejado en un árbol dendrítico más ramificado y un incremento del perímetro del cuerpo celular (1,25 veces, $P<0,001$; Fig. 36 F), un aumento en la longitud total de las neuritas (1,85 veces, $P<0,001$; Fig. 36 G), un mayor número de neuritas secundarias (1,72 veces, $P<0,05$), totales (1,5 veces, $P<0,05$) (Fig. 36 H) y de ramificaciones por neurita principal (1,62 veces, $P<0,05$) que las neuronas control (Fig. 36 I). Por el contrario, las neuronas tratadas con NT-3 no experimentaron cambios significativos respecto a las neuronas control.

A los 21 días de cultivo, los números totales de neuronas MAP2ab⁺ y GABA⁺ fueron similares en las tres condiciones (Fig. 37 D), aunque al igual que a 14 DIV, se obtuvo una reducción no significativa en los porcentajes de neuronas GABAérgicas en los cultivos tratados con BDNF o NT-3 comparado con los control (36,34%, 24,36% y 25,05%: control, BDNF y NT-3, respectivamente; Fig. 37 E). Al igual que a los 14 días en cultivo, las neuronas GABA⁺ expuestas a BDNF presentaron una morfología más compleja, con un aumento del perímetro del cuerpo celular (incremento del 13,22%, $P<0,05$; Fig. 37 F) y de la longitud de las neuritas (incremento del 82% de la longitud total, $P<0,01$; y del 52,32% de la longitud por neurita, $P<0,005$; Fig. 37 G y J). En cambio, los cultivos tratados con NT-3 no presentaron diferencias con respecto al control.

Además, cuando comparamos los resultados obtenidos a 14 DIV y 21 DIV, observamos que las neuronas GABAérgicas derivadas de CMBOe sufrieron una eliminación de neuritas en todas las condiciones, siendo más llamativa la pérdida en los cultivos control y BDNF, donde se observó una reducción en el número de neuritas totales del 34% ($P<0,05$) y del 47,1% ($P<0,01$), respectivamente (Fig. 36 y 37 H, y figura resumen 41A). Esta reducción en el número de neuritas provocó una disminución de la longitud total de las neuronas en todas las condiciones. Sin embargo, en las neuronas de los cultivos tratados con BDNF, la longitud por neurita se incrementó un 34,96% a los 21DIV comparado con los cultivos de 14DIV ($P<0,01$) (Fig. 36 y 37 J, y figura resumen 41B). Por otro lado, el perímetro del cuerpo celular de las neuronas GABA⁺ tratadas con NT-3 se incrementó un 9,7% a los 21DIV ($P<0,001$), mientras que en los cultivos control se mantuvo constante y en los tratados con BDNF hubo una ligera disminución no significativa (Fig. 36 y 37 F, y figura resumen 41B).

2.2.2. Neuronas dopaminérgicas

A continuación, analizamos el efecto de BDNF y NT-3 en neuronas dopaminérgicas derivadas de CMBOe utilizando un anticuerpo contra TH (Hurtado-Chong et al. 2009).

Tras 14 días en diferenciación, los números totales de neuronas MAP2ab⁺ y TH⁺, así como el porcentaje de neuronas TH⁺, fueron similares en los cultivos tratados con BDNF o NT-3 y los cultivos control (Fig. 38 D y E). En los cultivos tratados con BDNF se detectaron neuronas TH⁺ aparentemente más grandes que en los cultivos control. Este mayor tamaño se vio reflejado en un aumento del perímetro del cuerpo celular (del 17,69%, $P<0,01$; Fig. 38 F), un incremento de la longitud total de las neuritas (del 50%, $P<0,05$; Fig. 38 G) y un mayor número de ramificaciones debido al incremento del

62,14% en el número de neuritas secundarias ($P < 0,05$; Fig. 38 H) y del número de neuritas secundarias por neurita primaria (del 38,62%, $P < 0,01$; Fig. 38 I). Las neuronas TH⁺ de los cultivos tratados con NT-3 experimentaron un incremento del 11,64% ($P < 0,05$) en el tamaño del cuerpo celular comparado con las neuronas de los cultivos control (Fig. 38 F).

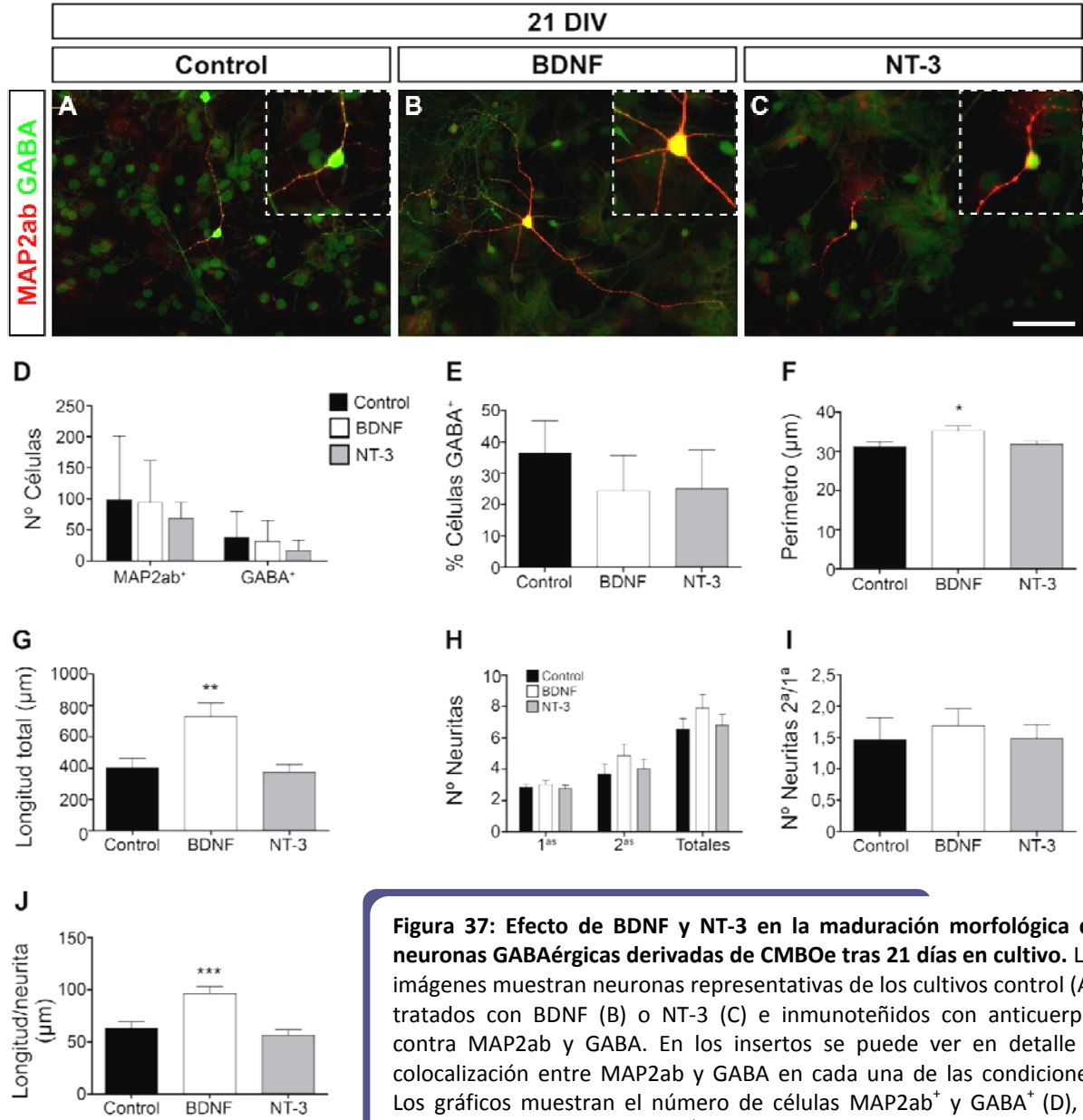


Figura 37: Efecto de BDNF y NT-3 en la maduración morfológica de neuronas GABAérgicas derivadas de CMBOe tras 21 días en cultivo. Las imágenes muestran neuronas representativas de los cultivos control (A), tratados con BDNF (B) o NT-3 (C) e inmunoteñidos con anticuerpos contra MAP2ab y GABA. En los insertos se puede ver en detalle la colocalización entre MAP2ab y GABA en cada una de las condiciones. Los gráficos muestran el número de células MAP2ab⁺ y GABA⁺ (D), el porcentaje de neuronas GABA⁺ (E), el perímetro neuronal (F), la longitud total de las neuritas (G), el número de neuritas primarias, secundarias y totales (H), número de neuritas 2^a por neurita 1^a (I) y la longitud por neurita (J) en las tres condiciones. Los resultados son la media \pm SEM de 4 cultivos por condición para el número de células MAP2ab⁺ y GABA⁺ y el porcentaje de neuronas GABA⁺. El análisis morfológico se realizó en 30 neuronas GABA⁺. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ (t de Student). Barra de escala (C) = 74,6 µm; insertos 20 µm.

A los 21 días, aquellos cultivos tratados con BDNF o NT-3 no mostraron diferencias en el número de células MAP2ab⁺ y TH⁺, ni en el porcentaje de células TH⁺, comparado con el control (Fig.

39 D y E). Las neuronas de los cultivos incubados con BDNF presentaron una longitud por neurita mayor a la de los cultivos control y tratados con NT-3 (incremento del 45,71%, $p < 0,01$; Fig. 39 J). Por el contrario, en los cultivos a los que se añadió NT-3 se encontraron neuronas con un menor número de neuritas totales (disminución del 51,34%, $p < 0,05$; Fig. 39 H).

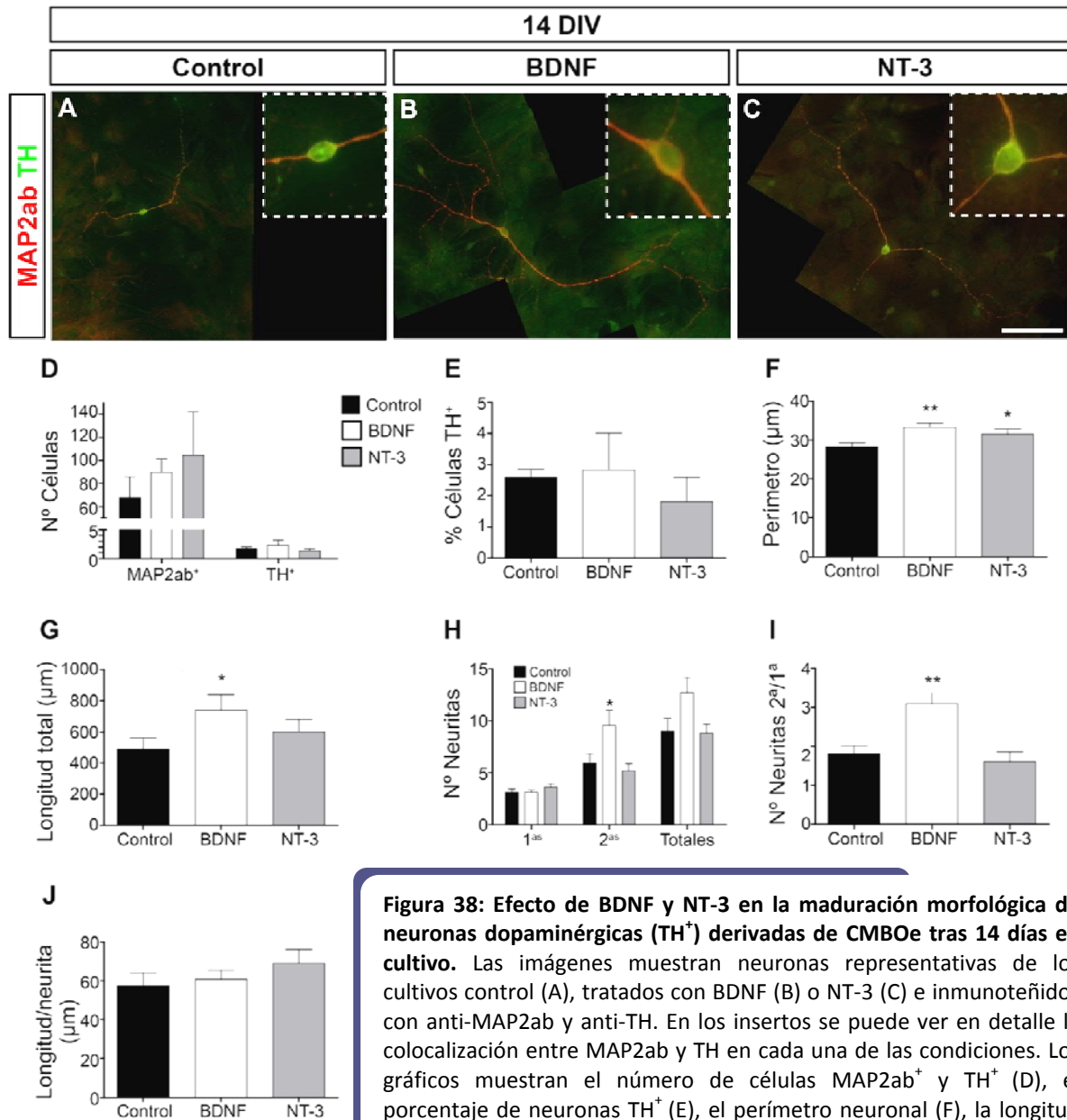


Figura 38: Efecto de BDNF y NT-3 en la maduración morfológica de neuronas dopaminérgicas (TH⁺) derivadas de CMBOe tras 14 días en cultivo. Las imágenes muestran neuronas representativas de los cultivos control (A), tratados con BDNF (B) o NT-3 (C) e inmunoteñidos con anti-MAP2ab y anti-TH. En los insertos se puede ver en detalle la colocalización entre MAP2ab y TH en cada una de las condiciones. Los gráficos muestran el número de células MAP2ab⁺ y TH⁺ (D), el porcentaje de neuronas TH⁺ (E), el perímetro neuronal (F), la longitud total de las neuritas (G), el número de neuritas primarias, secundarias y totales (H), número de neuritas 2ª por neurita 1ª (I) y la longitud por neurita (J) en las tres condiciones. Los resultados son la media \pm SEM de 3 cultivos por condición para el número de células MAP2ab⁺ y TH⁺ y el porcentaje de neuronas TH⁺. El análisis morfológico se realizó en 19-31 neuronas TH⁺. TH = tirosina hidroxilasa. *P < 0,05 y **P < 0,01 (t de Student). Barra de escala (C) = 74,6 μ m; insertos = 20 μ m.

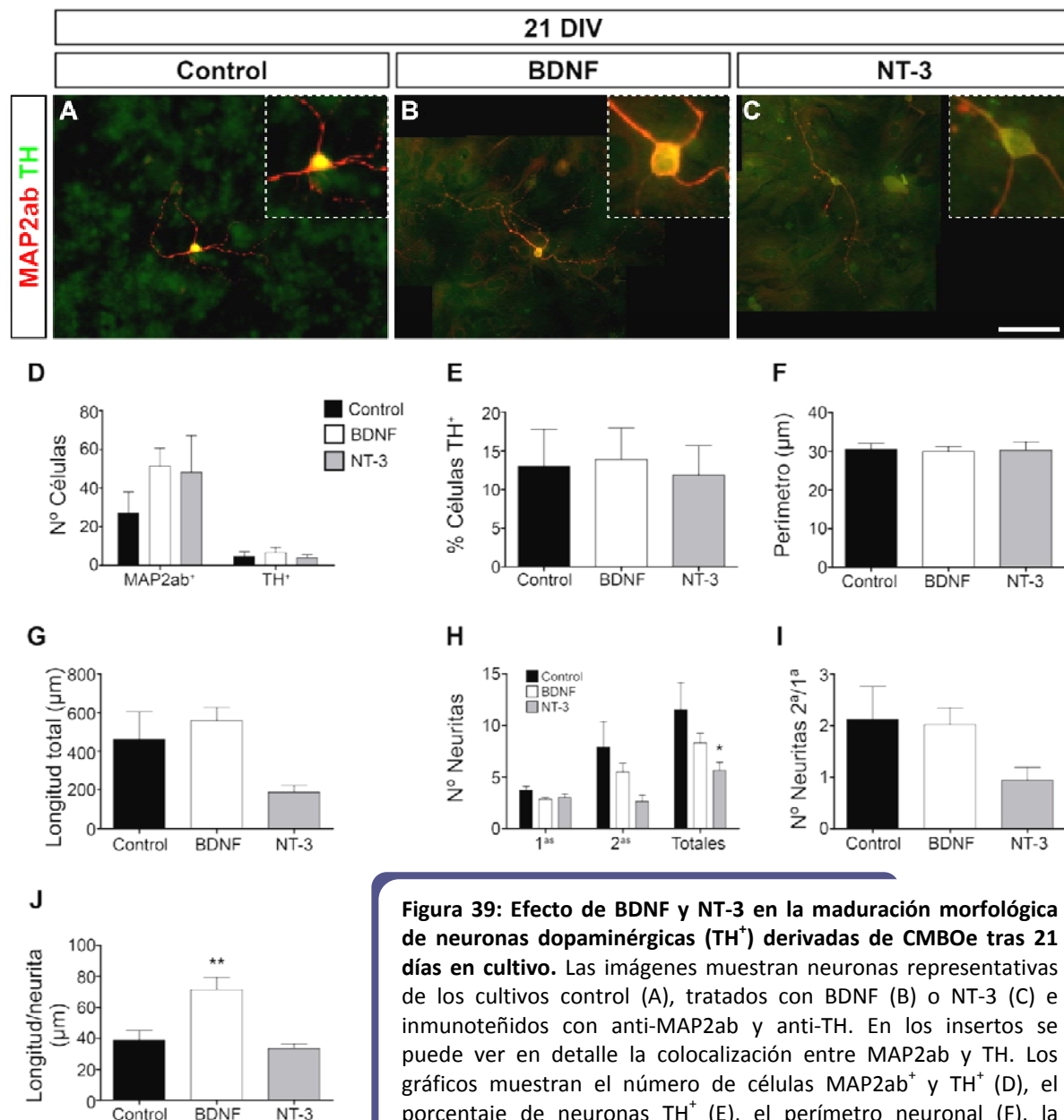


Figura 39: Efecto de BDNF y NT-3 en la maduración morfológica de neuronas dopaminérgicas (TH⁺) derivadas de CMBOe tras 21 días en cultivo. Las imágenes muestran neuronas representativas de los cultivos control (A), tratados con BDNF (B) o NT-3 (C) e inmunoteñidos con anti-MAP2ab y anti-TH. En los insertos se puede ver en detalle la colocalización entre MAP2ab y TH. Los gráficos muestran el número de células MAP2ab⁺ y TH⁺ (D), el porcentaje de neuronas TH⁺ (E), el perímetro neuronal (F), la longitud total de las neuritas (G), el número de neuritas primarias, secundarias y totales (H), número de neuritas 2^a por neurita 1^a (I) y la longitud por neurita (J) en las tres condiciones. Los resultados son la media ± SEM de 3 cultivos por condición para el número de células MAP2ab⁺ y TH⁺ y el porcentaje de neuronas TH⁺. El análisis morfológico se realizó en 13-24 neuronas TH⁺. *P < 0,05 y **P < 0,01 (t de Student). TH = tirosina hidroxilasa. Barra de escala (C) = 74,6 μm; insertos = 20 μm.

Al comparar los resultados obtenidos a los 14 DIV y 21DIV, observamos que en los cultivos control se produjo un ligero incremento, no significativo, del número de neuritas de las células TH⁺, mientras que en los cultivos tratados con BDNF y NT-3 se produjo una reducción del 34,8% y del 37 %, respectivamente (P<0,05) (Fig. 38 y 39 H, y figura resumen 41D). Además, en los cultivos expuestos a NT-3 se observó una disminución 51,7% de la longitud/neurita entre los 14 DIV y los 21 DIV (P<0,001) (Fig. 38 y 39 G, y figura resumen 41E). Por otro lado, en las neuronas cultivadas con

BDNF sufrieron una reducción del 9,7% del perímetro del cuerpo celular entre los 14 DIV y los 21 DIV ($P < 0,05$) (Fig. 38 y 39 F, y figura resumen 41F).

2.2.3. Neuronas glutamatérgicas

Otro subtipo de neuronas del BO son las neuronas glutamatérgicas que expresan los factores de transcripción Tbr1 y Tbr2 (Mendez-Gomez et al. 2011; Mizuguchi et al. 2012). En cultivos de neuronas derivados de CMBOe encontramos porcentajes muy bajos de neuronas Tbr1⁺ o Tbr2⁺ (entre 0% y 1,5%) tanto en los cultivos control como en los tratados con neurotrofinas. Debido al reducido y variable número de neuronas obtenidas, no se pudo hacer un análisis morfológico de este tipo neuronal.

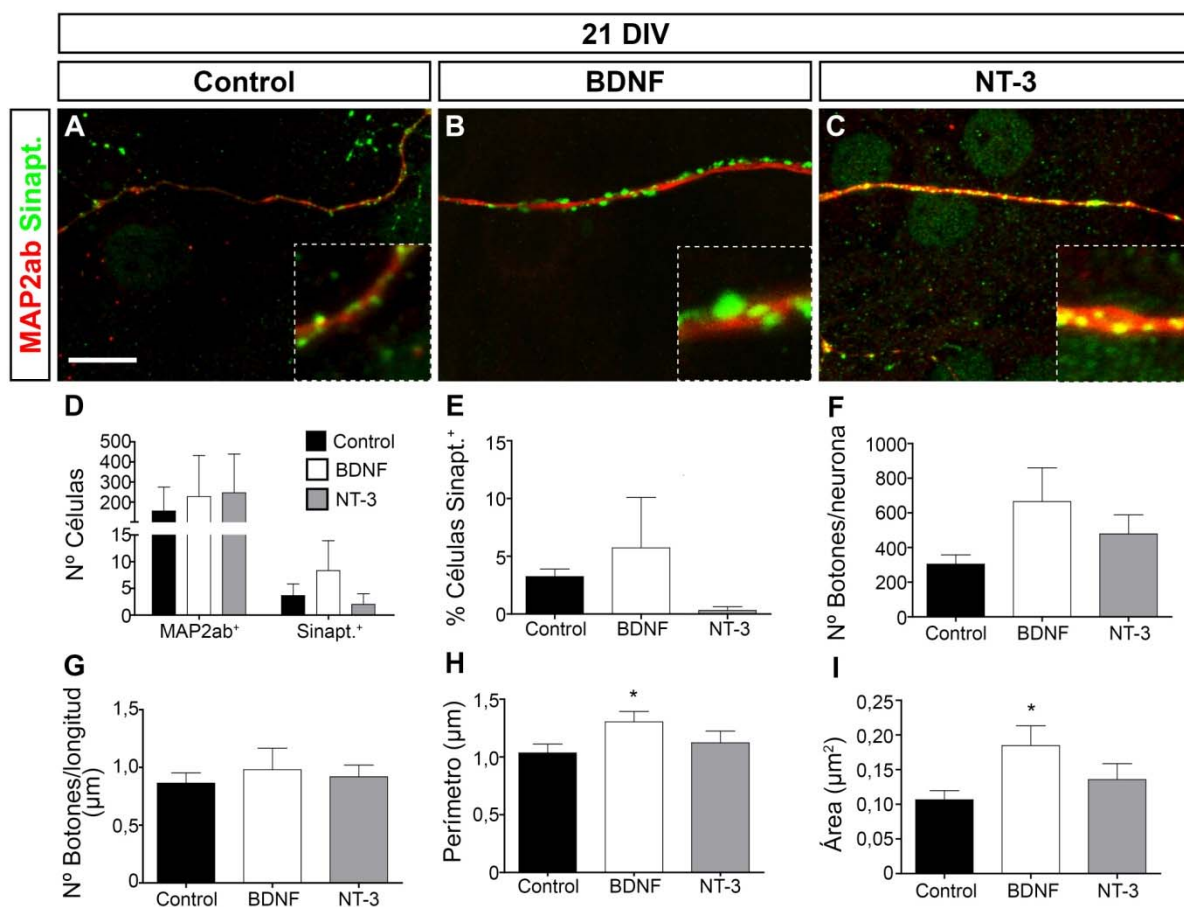


Figura 40: Efecto de BDNF y NT-3 en la maduración sináptica de neuronas derivadas de CMBOe tras 21 días en cultivo. Las imágenes muestran las neuritas de neuronas derivadas de CMBOe representativas de los cultivos control (A), tratados con BDNF (B) o NT-3 (C) e inmunoteñidos con anti-MAP2ab y anti-Sinaptofisina. En los insertos se pueden ver en detalle los botones sinápticos formados en cada una de las condiciones. Los gráficos muestran el número de células MAP2ab⁺ y Sinaptofisina⁺ (D), el porcentaje de neuronas Sinaptofisina⁺ (E), el número de botones por neurona (F), la densidad de botones sinápticos por longitud (G), el perímetro medio del botón por neurona (H) y el área media del botón por neurona (I) en las tres condiciones. Los resultados son la media \pm SEM de 3 cultivos por condición para el número de células MAP2ab⁺ y Sinaptofisina⁺ y el porcentaje de neuronas Sinaptofisina⁺. La cuantificación y el análisis morfológico de los botones sinápticos se realizó en 13-15 neuronas. Sinapt. = Sinaptofisina. * $P < 0,05$ (t de Student). Barra de escala (A) = 10,37 μ m; insertos = 2,6 μ m.

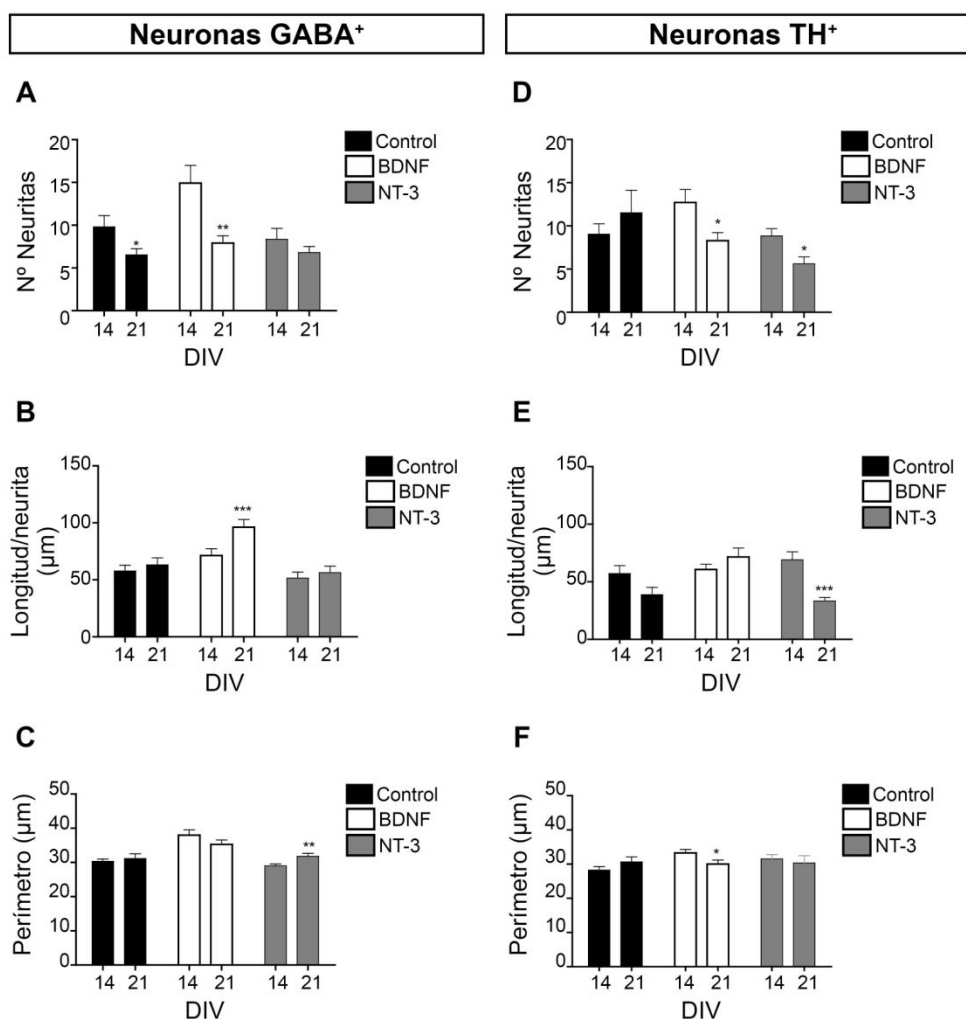


Figura 41: Análisis morfológico comparativo de neuronas GABAérgicas y dopaminérgicas (TH⁺) derivadas de CMBOe tras 14 y 21 días en cultivo. Los gráficos muestran el número de neuritas totales (A y D), la longitud por neurita (B y E) y el perímetro neuronal (C y F) en neuronas GABA⁺ y TH⁺ derivadas de CMBOe en cultivos control o tratados con BDNF o NT-3. Los resultados son la media \pm SEM de 13-30 neuronas GABA⁺ o TH⁺ de 3-4 cultivos por condición y han sido tomadas de las figuras 36, 37, 38 y 39. *P < 0,05, **P < 0,01 y ***P < 0,001 (t de Student). TH = tirosina hidroxilasa.

2.3. Efecto de BDNF y NT-3 en la maduración sináptica neuronal

Para analizar el efecto de las neurotrofinas BDNF y NT-3 en la sinaptogénesis de neuronas derivados de CMBOe, sembramos las células en condiciones de diferenciación y tras 21 días en cultivo las inmunoteñimos con un anticuerpo contra sinaptofisina, marcador de sinapsis (Vicario-Abejon et al. 1998; Vergaño-Vera et al. 2006). En las tres condiciones, encontramos números similares de neuronas MAP2ab⁺. Las diferencias observadas en el número de neuronas sinaptofisina⁺ no fueron estadísticamente significativas, así como los porcentajes de neuronas positivas para sinaptofisina (Fig. 40 D y E). Las neuronas de los cultivos tratados con BDNF presentaron un mayor número de botones sinaptofisina⁺ que las de los cultivos control, aunque el aumento de 2,18 veces no fue estadísticamente significativo (P=0,09), sin afectarse la densidad de botones por longitud lo que indica que el incremento en el número de botones está directamente relacionada con el mayor crecimiento de las dendritas MAP2ab (Fig. 40 F y G). Además, se observó un tamaño mayor de los

botones en las neuronas de los cultivos con BDNF que en los controles, reflejado en un incremento del 26,09% en el perímetro de los botones ($P<0,05$; Fig. 40 H) y un 44,44% en el área ($P<0,05$; Fig. 40 I).

En conjunto, nuestros resultados muestran que BDNF promueve la maduración morfológica de las neuronas GABAérgicas derivadas de CMBOe en cultivo, regulando al menos dos procesos celulares, inicialmente, BDNF produce un aumento de la longitud total debido a un incremento en el número de neuritas, y posteriormente, favorece el mantenimiento y crecimiento de las neuritas de mayor tamaño. Un efecto similar se observó en las neuronas TH⁺ expuestas a BDNF pero en menor medida. Sin embargo, NT-3 tuvo un papel más limitado en la maduración de estos dos tipos neuronales (Fig.41). Adicionalmente, BDNF promueve la formación de sinapsis en neuronas derivadas de CMBOe, aumentando específicamente el tamaño de los botones sinápticos.

3. Función del IGF-I durante la sinaptogénesis embrionaria del BO y del HP

Además de las neurotrofinas, otros factores como el IGF-I tienen actividad sinaptogénica (Fernandez y Torres-Aleman 2012). De hecho, se ha descrito que IGF-I regula la formación de sinapsis en distintas regiones del cerebro embrionario y adulto. Así, las neuronas de la corteza de ratones adultos KO para IGF-I poseen una menor complejidad dendrítica y una disminución de espinas dendríticas comparadas con los animales WT (Cheng et al. 2003). En el BO embrionario y neonatal, se ha visto que IGF-I e IGF-II son necesarios para la correcta inervación del BO por los axones del nervio olfativo (Scolnick et al. 2008). En el HP, se observó un mayor número de neuronas y de sinapsis en el GD de ratones postnatales que sobreexpresaban IGF-I en el cerebro (O'Kusky et al. 2000). Además, se ha visto que el ejercicio físico favorece la formación de espinas dendríticas en CA1, efecto mediado por los niveles séricos de IGF-I en ratones adultos (Glasper et al. 2010). De manera que IGF-I parece regular la sinaptogénesis en distintas regiones cerebrales y en distintos momentos del desarrollo, por lo que nos planteamos estudiar el impacto de la delección de IGF-I en la sinaptogénesis embrionaria del BO y del HP.

3.1. Papel de IGF-I en la sinaptogénesis del BO embrionario

En primer lugar, quisimos analizar por Western blot los niveles totales de varias proteínas localizadas en la sinapsis (Sinapsina I y Sinaptofisina I como marcadores presinápticos generales y vGlut1 como marcador presináptico de neuronas glutamatérgicas) (Vicario-Abejón et al. 2002; Mendez-Gomez et al. 2011) en el BO de embriones E18,5 WT y KO para IGF-I (Fig. 42). En muestras de embriones KO se halló una reducción, no significativa, de los niveles relativos de Sinapsina I comparado con los WT (reducción del 82%, $P=0,26$), siendo los niveles muy variables entre animales WT de distintas camadas. Por el contrario, no se detectaron diferencias en los niveles relativos de Sinaptofisina I y vGlut1 de los animales KO con respecto a los animales WT.

A continuación, se analizó con microscopia confocal el marcaje de Sinaptofisina y vGlut1 en secciones coronales del BO obtenidas de embriones E18,5 WT y KO (Fig. 43). Se observó que el marcaje para Sinaptofisina y vGlut1 se localizaba principalmente en la CPE y en la CG (Fig. 43 A-B y F-G). Además, analizamos la cantidad de fluorescencia (medida como porcentaje de área marcada

respecto al área total) para cada anticuerpo en la CPE, la CG y en toda la sección, no encontrándose diferencias entre los animales WT y KO (Fig. 43 C-E y H-J).

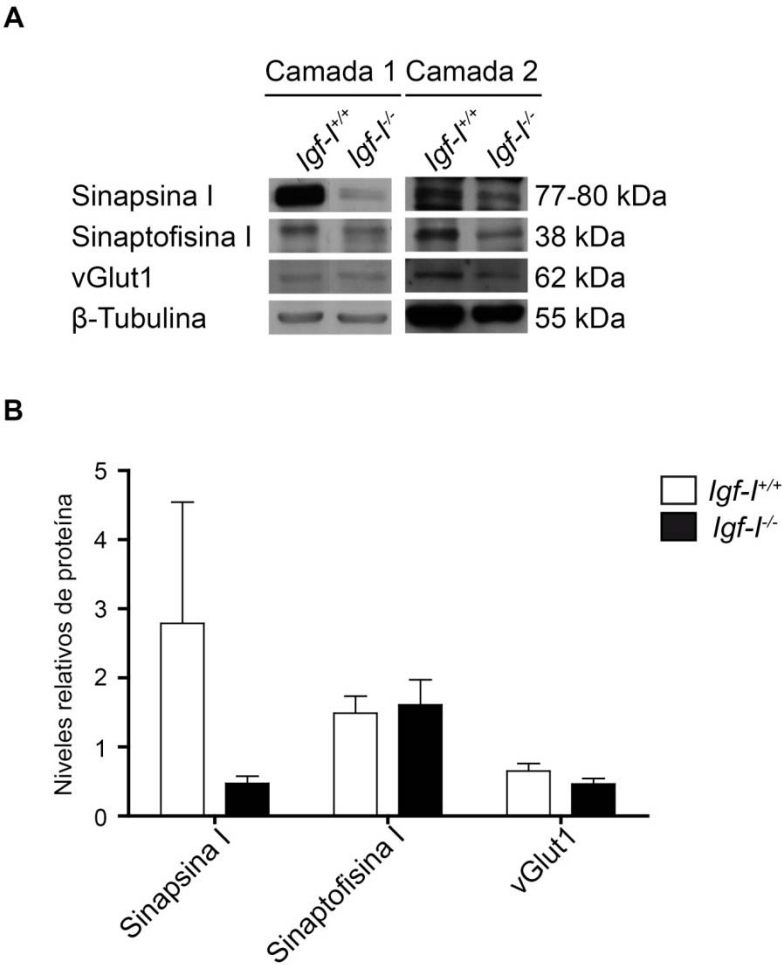
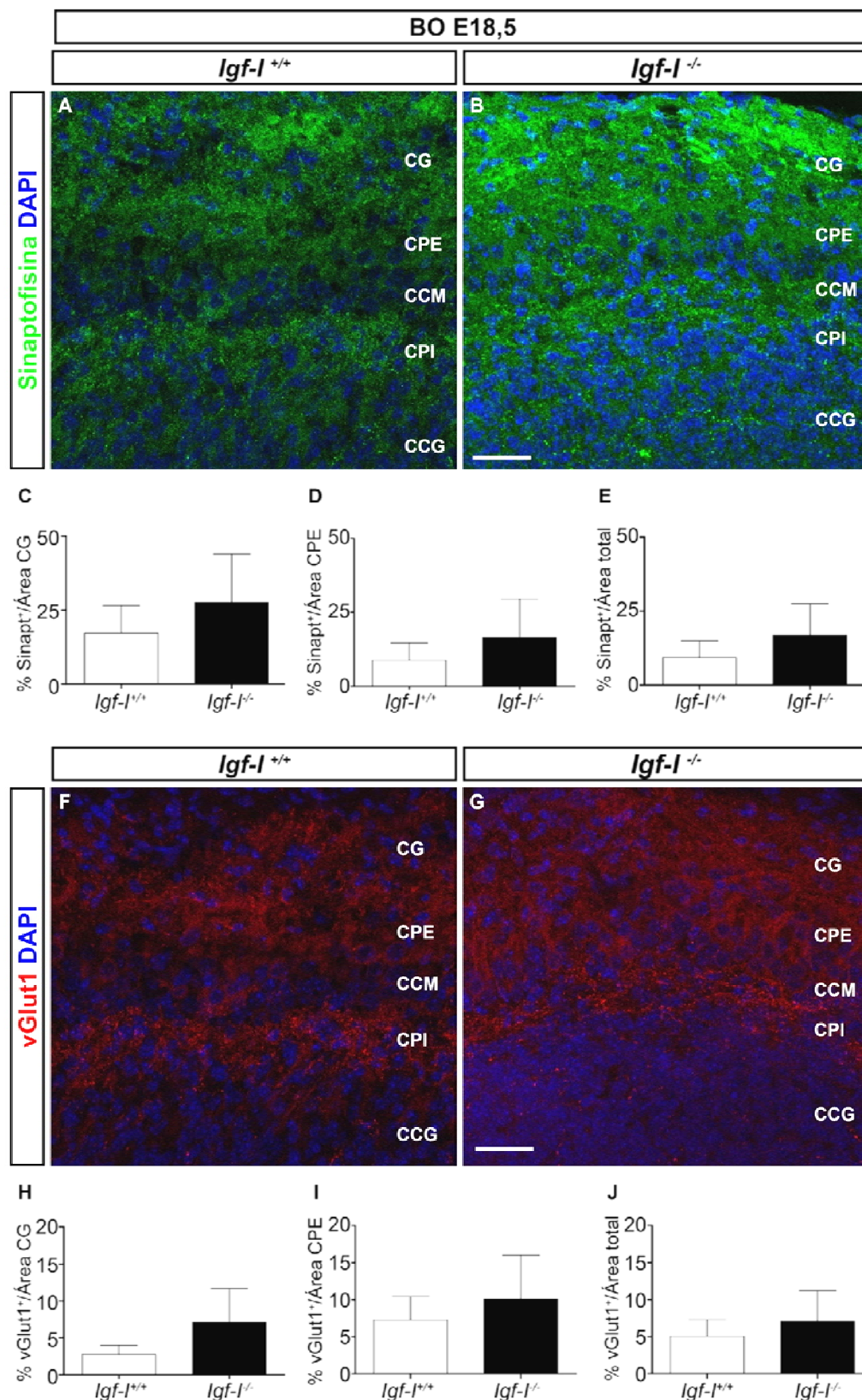


Figura 42: Análisis mediante Western Blot de proteínas de sinapsis en el BO de embriones *Igf-1^{-/-}*. Los BOs de embriones E18,5 WT y KO fueron disecados, las proteínas totales extraídas, separadas en geles de acrilamida y transferidas a membranas que se inmunotñeron con anticuerpos específicos. En la imagen (A) se muestran las bandas obtenidas para Sinapsina I, Sinaptofisina I, vGlut1 y β-tubulina (control de carga) en animales *Igf-1^{+/+}* y *Igf-1^{-/-}*. Además se indican los pesos moleculares de las proteínas en estudio. En el gráfico (B) se representan los niveles relativos de cada proteína respecto a la β-tubulina en animales WT y KO después de realizarse las densitometrías. Los resultados son la media ± SEM de 3-4 animales por genotipo.

Para estudiar con más detalle los botones sinápticos formados durante la edad embrionaria, realizamos cultivos de neuronas derivadas del BO de embriones WT y KO y las mantuvimos durante 14 días *in vitro* en ausencia de insulina. En estas condiciones, se obtuvieron números similares de neuronas MAP2ab⁺, GABA⁺ y GABA⁻ en ambos genotipos (Fig. 44 A-C). Asimismo, la mayoría de las neuronas presentes en ambos casos fueron GABA⁺, obteniéndose porcentajes próximos al 90% (Fig. 44 A-B y D). Tanto las neuronas de cultivos WT como las obtenidas a partir de embriones KO poseían morfologías aparentemente maduras y expresaron los marcadores Sinaptofisina y vGlut1 (Fig. 45 A-B y G-H). En las neuronas del BO de animales KO no se detectaron diferencias en el número total de botones Sinaptofisina⁺, ni en la densidad ni en el tamaño de los botones, comparado con las neuronas obtenidas de embriones WT (Fig. 45 C-F). Sin embargo, las neuronas de animales KO presentaron un mayor número de botones vGlu1⁺ (incremento de 4,91 veces, P<0,05), así como una densidad de botones mayor que las neuronas WT (incremento de 6 veces, P<0,01) (Fig. 45 I-J). Además, se observó una ligera disminución, no significativa, en el tamaño de los botones vGlut1⁺ de las neuronas KO comparado con los animales WT (disminución del 18,1% en el área, P=0,27) (Fig. 45 K-L).



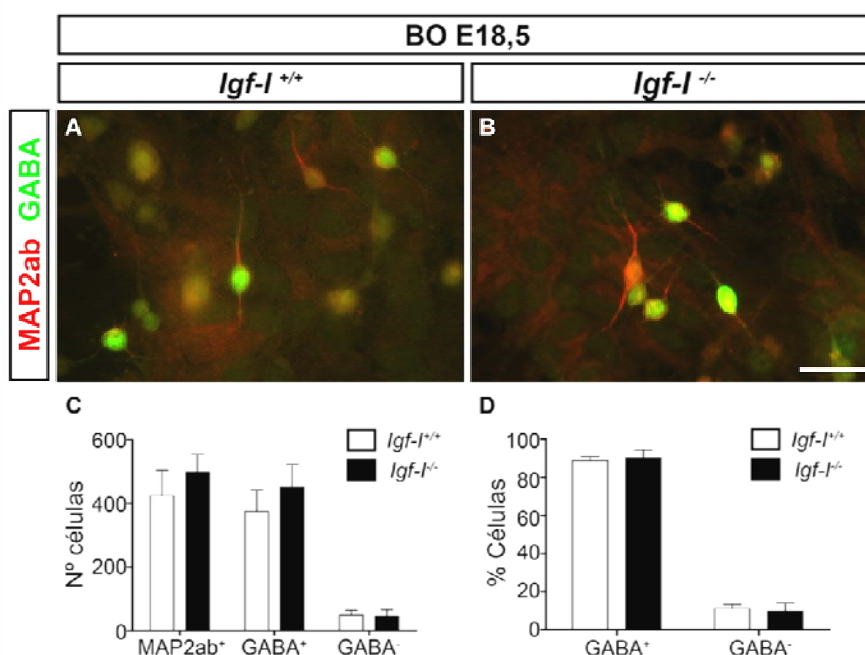


Figura 44: Caracterización de las neuronas obtenidas a partir del BO de embriones *Igf-I*^{+/+} y *Igf-I*^{-/-}. Los BOs de embriones E18,5 WT y KO fueron disecados y las células se cultivaron en ausencia de insulina durante 14 días. Posteriormente, los cultivos fueron inmunoteñidos contra MAP2ab y GABA. (A-B) Imágenes representativas de neuronas MAP2ab⁺ y GABA⁺ de cultivos WT y KO. En los gráficos se representa el número de neuronas MAP2ab⁺, GABA⁺ y GABA⁻ (C) el porcentaje de neuronas GABA⁺ y GABA⁻ (D) en cultivos de BO WT y KO. Los resultados son la media \pm SEM de 3 cultivos por genotipo. Barra de escala (B) = 25 μ m.

3.2. Papel de IGF-I en la sinaptogénesis del HP embrionario

De igual manera que para el BO, determinamos por Western blot los niveles totales de Sinapsina I, Sinaptofisina I y vGlut1 en el HP de embriones E18,5 WT y KO para IGF-I (Fig. 46). Se detectaron dos bandas de Sinapsina I y Sinaptofisina I que se cuantificaron por separado. Los niveles relativos de las proteínas estudiadas resultaron muy similares en los animales KO con respecto a los animales WT.

Seguidamente, se analizó el marcaje de Sinaptofisina y vGlut1 en secciones coronales del HP obtenidas de embriones E18,5 WT y KO (Fig. 47). El marcaje para Sinaptofisina y vGlut1 se localizó en la zona intermedia (ZI) sitiada entre el GD y el CA (Fig. 47 A-B y D-E), pero no se observaron diferencias en la cantidad de fluorescencia para cada anticuerpo entre los animales WT y KO (medida como porcentaje de área marcada respecto al área total) (Fig. 47 C y F).

Por último, analizamos en profundidad el número y tamaño de los botones sinápticos formados en neuronas derivadas del HP de embriones WT y KO, cultivadas durante 14 días *in vitro* en ausencia de insulina y con BDNF para favorecer la supervivencia neuronal (ver apartado 2.7 de Material y Métodos). En los cultivos realizados a partir de animales KO, se obtuvo un número mayor de neuronas MAP2ab⁺ que en los cultivos control (incremento del 34,2%, $P < 0,05$; Fig. 48 A-C). Además, tanto el número de neuronas GABA⁺ como GABA⁻ experimentó un incremento, no significativo, del 23,28% y del 34,18%, respectivamente, en los cultivos de embriones KO comparado con los WT. Sin embargo, no se observaron diferencias en el porcentaje de neuronas GABA⁺ entre

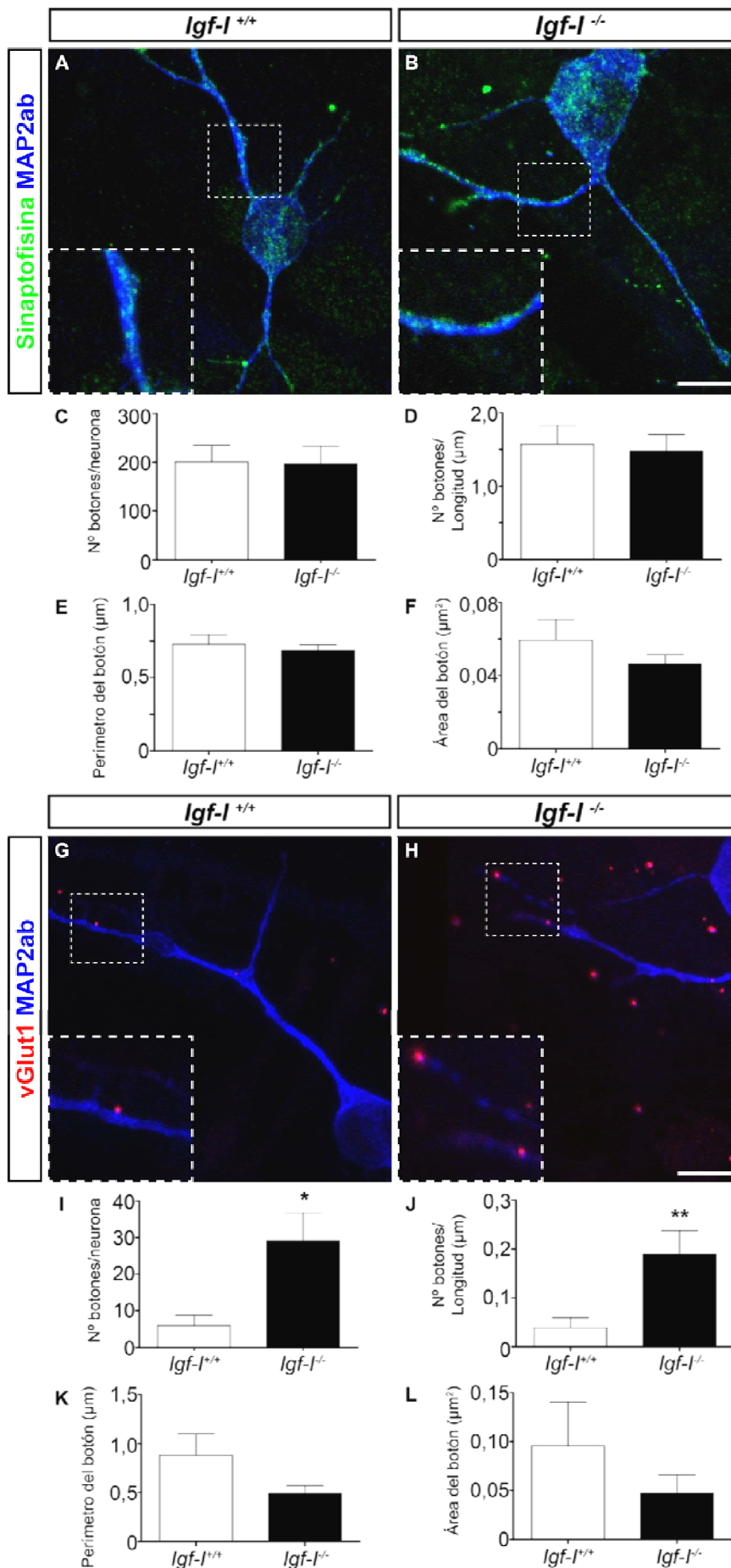


Figura 45: Análisis de botones sinápticos en cultivos de neuronas de BO de embriones *lgf-I^{-/-}*. Cultivos de neuronas obtenidas a partir del BO de embriones E18,5 WT y KO fueron inmunoteñidos con anticuerpos específicos. **(A-B)** Imágenes representativas de neuronas del BO WT y KO inmunoteñidas contra Sinaptofisina I y MAP2ab. En los insertos se observan los botones Sinaptofisina⁺ a mayor aumento. Los gráficos muestran el número y la densidad de botones Sinaptofisina⁺ **(C-D)** y el perímetro y el área de botones **(E-F)** en neuronas de BO WT y KO. **(G-H)** Imágenes representativas de neuronas de BO WT y KO inmunoteñidas contra vGlut1 y MAP2ab. En los insertos se observan los botones vGlut1⁺ a mayor aumento. Los gráficos muestran el número y la densidad de botones vGlut1⁺ **(I-J)** y el perímetro y el área de botones **(K-L)** en neuronas de BO WT y KO. Los resultados son la media ± SEM de 15 neuronas de 3 animales por genotipo. Barra de escala (B y H) = 10,38 µm, insertos = 5,19 µm. *P < 0,05 y **p < 0,01 (t de Student).

cultivos WT y KO (WT: $71,12\% \pm 6,264$, KO: $65,12\% \pm 6,502$; Fig. 48 A-B y D). Tanto las neuronas derivadas de ratones WT como KO formaron neuronas maduras que expresaron Sinaptofisina⁺ y vGlu1⁺ en botones sinápticos (Fig. 49 A-B y G-H). Se encontró que las neuronas del HP de animales KO poseían un mayor número total de botones Sinaptofisina⁺ (2,5 veces) y una densidad mayor de botones (1,62 veces) comparado con las neuronas obtenidas de embriones WT, sin afectarse el tamaño de los botones (Fig. 49 C-F). Además, en las neuronas procedentes del HP de animales KO se detectó un incremento de 3 veces en el número de botones vGlu1⁺ ($P < 0,05$, Fig. 49 I).

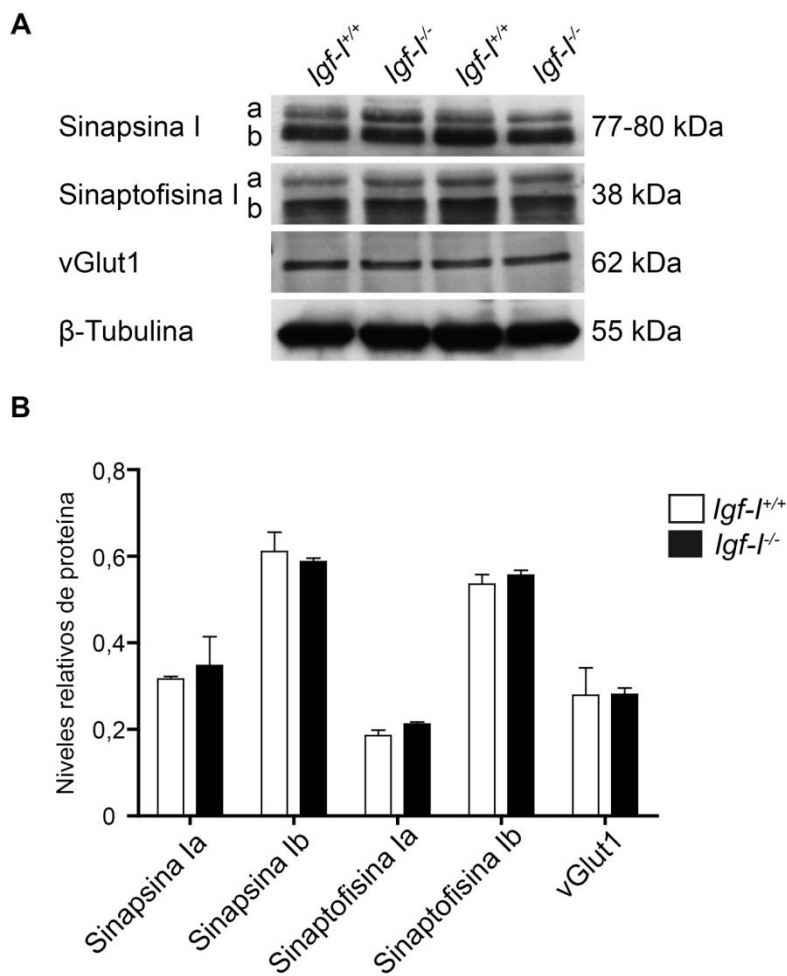


Figura 46: Análisis mediante Western Blot de proteínas de sinapsis en el HP de embriones *Igf-I^{-/-}*. Los HPs de embriones E18,5 WT y KO fueron disecados, las proteínas totales extraídas, separadas en geles de acrilamida y transferidas a membranas que se inmunotifieron con anticuerpos específicos. En la imagen (A) se muestran las bandas obtenidas para Sinapsina I, Sinaptofisina I, vGlu1 y β-tubulina (control de carga) en animales *Igf-I^{+/+}* y *Igf-I^{-/-}*. Además se indican los pesos moleculares de las proteínas en estudio. En el gráfico (B) se representan los niveles relativos de cada proteína respecto a β-tubulina en animales WT y KO después de realizarse las densitometrías. Los resultados son la media \pm SEM de 2 animales por genotipo.

Nuestros resultados muestran que IGF-I podría regular la eliminación de sinapsis en el BO y en el HP en algunos estadios del desarrollo embrionario, siendo mayor su efecto en neuronas hipocampales.

4. Función de IGF-I durante la neurogénesis hipocampal postnatal y adulta

Se ha descrito que IGF-I es necesario para la correcta formación de las capas del BO durante el periodo embrionario (Pichel et al. 2003; Vicario-Abejón et al. 2003). Durante el periodo postnatal y adulto, IGF-I promueve la salida de los neuroblastos desde la ZSV hasta el BO así como su posterior migración radial y correcto posicionamiento en las distintas capas del BO. Por otro lado, se ha descrito que los embriones E18,5 carentes de *Igf-I* no presentan alteraciones en la estructura

anatómica general del HP (Vicario-Abejon et al. 2004) aunque en ratones adultos, se ha observado una reducción del volumen del HP y una pérdida de neuronas parvoalbúmina en el mismo (Beck et al. 1995). Adicionalmente, los niveles séricos de IGF-I regulan el efecto neurogénico producido por el ejercicio físico (Trejo et al. 2008). Sin embargo, no todos los efectos del ejercicio físico son mediados por IGF-I; por ejemplo, las neuronas inmaduras responden al ejercicio independientemente de los niveles de IGF-I en suero (Llorens-Martín et al. 2010). A la vista de estos antecedentes, nos propusimos estudiar en profundidad el modo por el cual IGF-I regula la neurogénesis en el GD del HP.

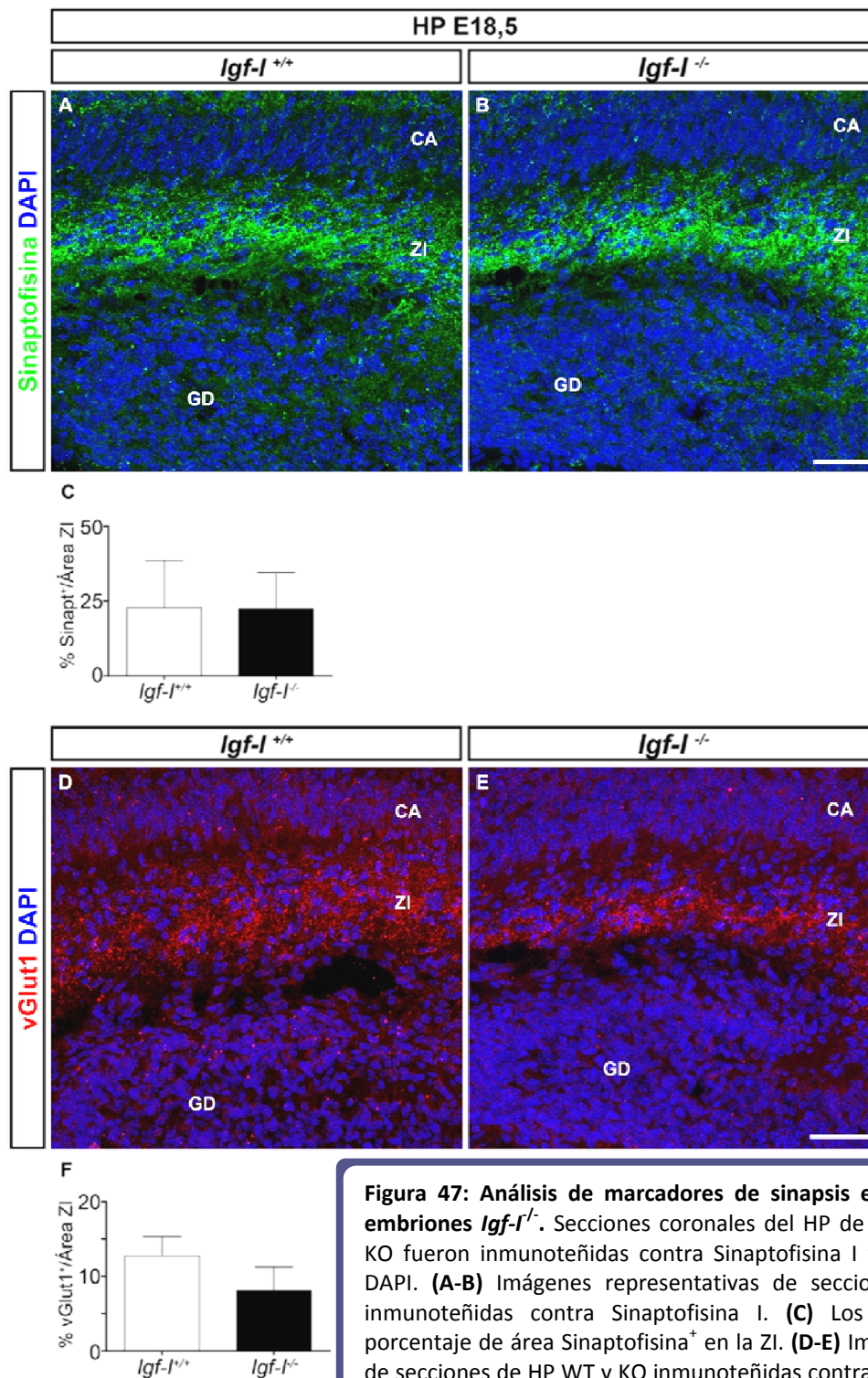


Figura 47: Análisis de marcadores de sinapsis en secciones de HP de embriones *Igf-I*^{-/-}. Secciones coronales del HP de embriones E18,5 WT y KO fueron inmunoteñidas contra Sinaptofisina I y vGlut1 y teñidas con DAPI. **(A-B)** Imágenes representativas de secciones del HP WT y KO inmunoteñidas contra Sinaptofisina I. **(C)** Los gráficos muestran el porcentaje de área Sinaptofisina⁺ en la ZI. **(D-E)** Imágenes representativas de secciones de HP WT y KO inmunoteñidas contra vGlut1. **(F)** Los gráficos muestran el porcentaje de área vGlut1⁺ en la ZI. Los resultados son la media ± SEM de 4 animales genotipo. Barra de escala (B y E) = 43,85 µm. CA=Asta de Ammón, GD=giro dentado, ZI=zona intermedia.

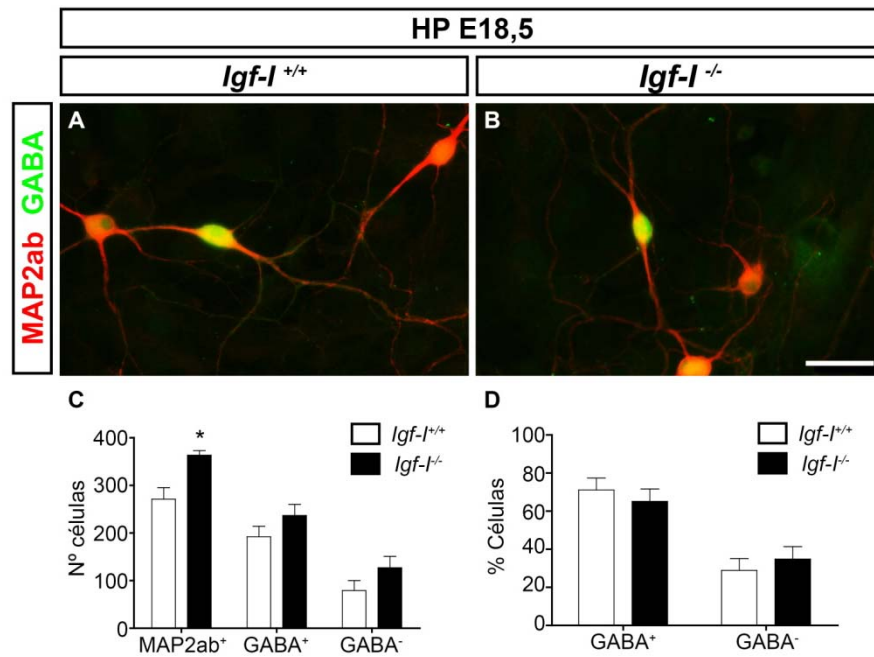


Figura 48: Caracterización de las neuronas obtenidas a partir del HP de embriones *Igf-1^{+/+}* y *Igf-1^{-/-}*. Los HP de embriones E18,5 WT y KO fueron disecados y las células disociadas fueron cultivadas en ausencia de insulina y con BDNF (20 ng/ml) durante 14 días. Seguidamente, los cultivos fueron inmunoteñidos contra MAP2ab y GABA. **(A-B)** Imágenes representativas de neuronas MAP2ab⁺ y GABA⁺ de cultivos de HP WT y KO. Los gráficos muestran el número de neuronas MAP2ab⁺, GABA⁺ y GABA⁻ **(C)** y el porcentaje de neuronas GABA⁺ y GABA⁻ **(D)** en cultivos de HP de WT y KO. Los resultados son la media ± SEM de 3 cultivos por genotipo. Barra de escala (B) = 33,33 μm. *P < 0,05 (t de Student).

4.1. Expresión de IGF-I e IGF-IR en el HP

4.1.1. Expresión de IGF-I en el GD del HP

Se ha visto que la expresión de *Igf-I* en el SNC es abundante durante el desarrollo embrionario y va disminuyendo con la maduración neuronal en la edad adulta (ver imágenes del Allen Brain Atlas en la Figura 9) (Russo et al. 2005; Fernandez y Torres-Aleman 2012). En el BO se ha detectado ARNm de *Igf-I* en las células mitrales, las empenachadas y periglomerulares (Bartlett et al. 1991). En la ZSV también se ha descrito la presencia de *Igf-I* (Bartlett et al. 1992). En el HP, *Igf-I* se expresa en el *stratum polimorph* donde se localizan las interneuronas (Bartlett et al. 1991) (ver Fig. 9 de la Introducción). El análisis de IGF-I a nivel de proteína ha sido menos estudiado en lo que se refiere a su distribución celular aunque se ha podido detectar en CMBO embrionario mediante el uso de anticuerpos (Vicario-Abejón et al. 2003) y en el propio bulbo adulto (Hurtado-Chong et al. 2009)

En esta tesis, quisimos estudiar en detalle en qué tipos celulares del GD se detectaba la presencia de IGF-I en ratones adultos. Para lo cual, realizamos inmunohistoquímica con anticuerpos específicos contra IGF-I y contra marcadores de distintos tipos celulares en secciones de ratones de 7 semanas (Fig. 50). Este anticuerpo contra IGF-I fue testado previamente en el laboratorio para comprobar su especificidad (Hurtado-Chong et al. 2009). Encontramos células IGF-I⁺ en la zona del hilus del GD, en menor medida en la CCG, y niveles relativamente altos de IGF-I en las células piramidales del asta de Ammón (Fig. 50 A-B). Un 42% de las células que expresaban IGF-I eran

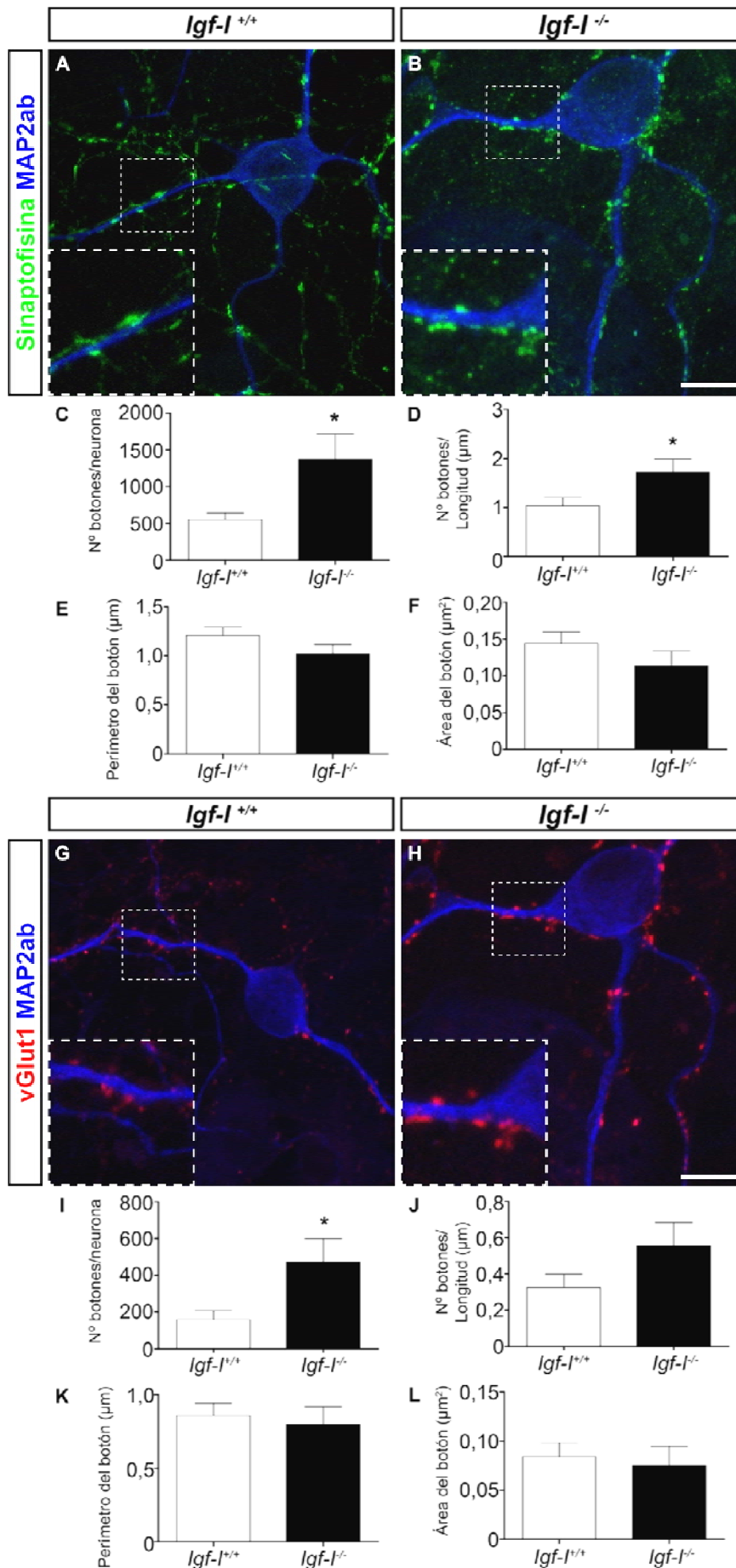


Figura 49: Análisis de botones sinápticos en cultivos de neuronas de HP de embriones *Igf-I*^{-/-}. Cultivos de neuronas obtenidas a partir del HP de embriones E18,5 WT y KO fueron inmunoteñidos con anticuerpos específicos. **(A-B)** Imágenes representativas de neuronas de HP WT y KO inmunoteñidas contra Sinaptofisina I y MAP2ab. En los insertos se observan los botones Sinaptofisina⁺ a mayor aumento. Los gráficos muestran el número y la densidad de botones Sinaptifisina⁺ **(C-D)** y el perímetro y el área de los botones **(E-F)** en neuronas de HP WT y KO. **(G-H)** Imágenes representativas de neuronas de HP WT y KO inmunoteñidas contra vGlut1 y MAP2ab. En los insertos se observan los botones vGlut1⁺ a mayor aumento. Los gráficos muestran el número y la densidad de botones vGlut1⁺ **(I-J)** y el perímetro y el área de botones **(K-L)** en neuronas de HP WT y KO. Los resultados son la media ± SEM de 14 neuronas de 3 animales por genotipo. Barra de escala (H) = 10,38 μm, insertos = 5,19 μm. *P < 0,05 (t de Student).

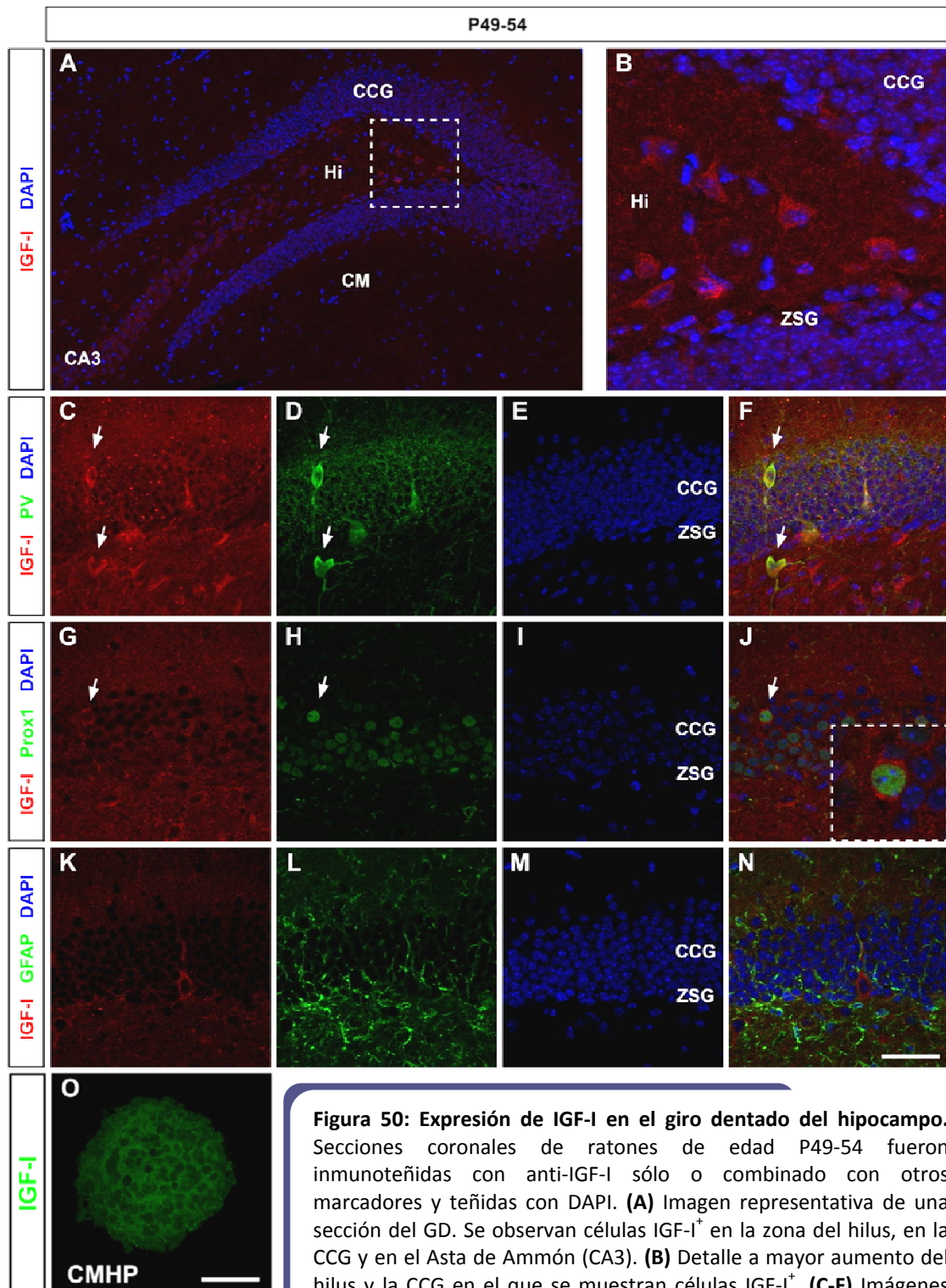


Figura 50: Expresión de IGF-I en el giro dentado del hipocampo.

Secciones coronales de ratones de edad P49-54 fueron inmunoteñidas con anti-IGF-I sólo o combinado con otros marcadores y teñidas con DAPI. **(A)** Imagen representativa de una sección del GD. Se observan células IGF-I⁺ en la zona del hilus, en la CCG y en el Asta de Ammón (CA3). **(B)** Detalle a mayor aumento del hilus y la CCG en el que se muestran células IGF-I⁺. **(C-F)** Imágenes representativas de la CCG de secciones del GD inmunoteñidas contra IGF-I/PV. Un 42% de las células IGF-I⁺ colocalizaron con PV. **(G-J)** Imágenes representativas de la CCG de secciones del GD inmunoteñidas contra IGF-I/Prox1. En el inserto se puede observar en detalle la colocalización de algunas células Prox1⁺ con IGF-I. **(K-N)** No se observó expresión de IGF-I en astrocitos pero los procesos GFAP⁺ estaban estrechamente ligados a las células IGF-I⁺. Las flechas indican algunas de las células positivas para cada marcador. **(O)** Imagen representativa de una neurosfera de CMHP obtenida de animales P21, crecida en presencia de FGF-2 y EGF, fijada e inmunoteñida con anti-IGF-I. Los resultados son representativos de 2-3 animales y de 2 cultivos. Barra de escala (N y O) = A, 90,91 µm; B, 23,36 µm; C-N, 38,14 µm, inserto=14,67 µm; O, 50 µm. CCG=capa de células grano, CM=capa molecular, Hi= hilus, ZSG=zona subgranular.

parvoalbúmina⁺ (PV⁺) (Fig. 50 C-F). También observamos colocalización de las células IGF-I⁺ con células Prox1⁺ (Fig. 50 G-J). Por el contrario, no encontramos células doblemente marcadas con IGF-I y calretinina (dato no mostrado). Y tampoco se detectó IGF-I en las células proliferativas (BrdU⁺) del GD (dato no mostrado). Por último, analizamos la expresión de IGF-I en astrocitos (GFAP⁺) y detectamos que los procesos de las células GFAP⁺ estaban íntimamente ligados a las células IGF-I⁺ pero no se observó colocalización de ambos marcajes (Fig. 50 K-N).

Además, comprobamos la expresión de IGF-I en CMN obtenidas del HP de ratones postnatales de 3 semanas. En estos cultivos se observó que la mayoría de las células que forman las neurosféricas eran IGF-I⁺ (Fig. 50 O).

Nuestros resultados demuestran que IGF-I se encuentra mayoritariamente en neuronas del GD *in vivo* y en CMN en cultivo.

4.1.2. Expresión de IGF-IR en el GD del HP

La expresión del receptor de IGF-I es elevada en el SNC, tanto durante el desarrollo embrionario como en el adulto. En ratones adultos, se ha descrito la presencia del ARNm del *Igf-IR* en los plexos coroideos, el BO y el HP, entre otras zonas (ver imágenes del Allen Brain Atlas en la Figura 9) (Russo et al. 2005; Fernandez y Torres-Aleman 2012).

Quisimos comprobar si las células grano del GD expresaban el receptor de IGF-I, para lo cual realizamos dobles marcajes para detectar el IGF-IR y Prox1 (Fig. 51). Este anticuerpo contra IGF-IR reconoce específicamente la subunidad β del receptor y no reacciona con otros receptores de la familia de la insulina. De este manera, encontramos células IGF-IR⁺ en la CCG, en la zona del hilus y en la capa CA3 de células piramidales. (Fig. 51 A-B). Además, observamos con relativa frecuencia que las células Prox1⁺ colocalizaban con las células IGF-IR⁺ (Fig. 51 C-F).

Asimismo, analizamos la expresión de IGF-IR en CMN obtenidas del HP de ratones postnatales de 3 semanas mediante inmunotinción. De esta manera pudimos detectar marcaje contra IGF-IR en la mayoría de las células que forman las neurosféricas (Fig. 51 G).

Por tanto, las células grano del GD expresan IGF-I y su receptor, de manera que este factor podría regular la neurogénesis de estas células en el ratón adulto, hecho que estudiaremos a continuación.

4.2. Fenotipo macroscópico del ratón KO para IGF-I y análisis del tamaño del GD

Para analizar el papel de IGF-I durante la neurogénesis hipocampal, elegimos como modelo un ratón que carece del factor IGF-I de manera global (Liu et al. 1993). Este ratón presenta alteraciones en el desarrollo somático y un menor tamaño cerebral (Baker et al. 1993; Liu et al. 1993; Pichel et al. 2003; Hurtado-Chong et al. 2009).

En primer lugar, quisimos corroborar ese menor tamaño somático y cerebral en nuestra colonia de ratones. Para lo cual, determinamos el peso corporal de los ratones a distintas edades postnatales (Fig. 52) y realizamos una estimación del volumen del HP y del área de la CCG (Fig. 53).

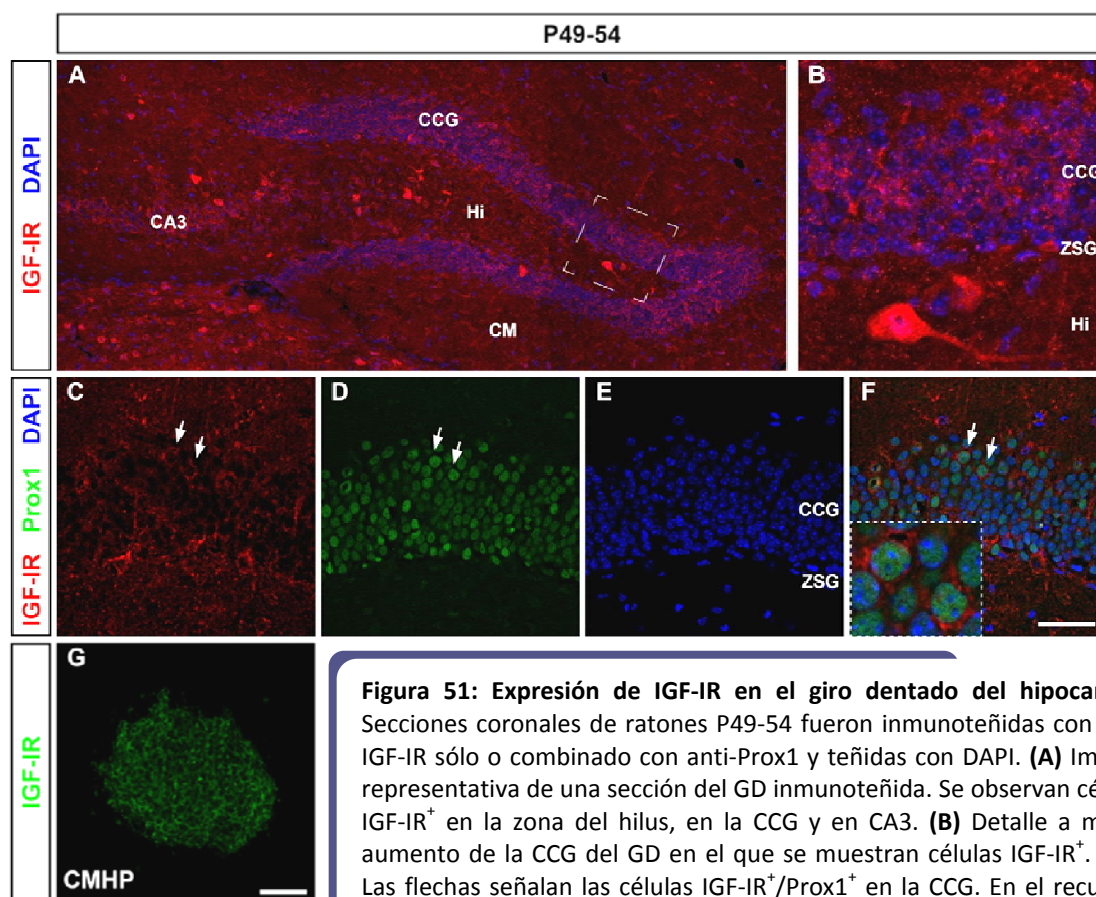


Figura 51: Expresión de IGF-IR en el giro dentado del hipocampo. Secciones coronales de ratones P49-54 fueron inmunoteñidas con anti-IGF-IR sólo o combinado con anti-Prox1 y teñidas con DAPI. **(A)** Imagen representativa de una sección del GD inmunoteñida. Se observan células IGF-IR⁺ en la zona del hilus, en la CCG y en CA3. **(B)** Detalle a mayor aumento de la CCG del GD en el que se muestran células IGF-IR⁺. **(C-F)** Las flechas señalan las células IGF-IR⁺/Prox1⁺ en la CCG. En el recuadro en F se puede observar a mayor aumento la colocalización entre IGF-IR y Prox1. **(G)** Imagen representativa de una neurosfera de CMHP obtenida de animales P21, crecida en presencia de FGF-2 y EGF, fijada e inmunoteñida con anti-IGF-IR. Los resultados son representativos de 2-3 animales y 2 cultivos. Barra de escala (F y G) = A, 112,98 μ m; B, 23,54 μ m; C-F, 45,98 μ m; inserto=14,17 μ m; G, 25 μ m. CCG=capa de células grano, CM=capa molecular, Hi= hilus, ZSG=zona subgranular.

A partir de la edad embrionaria E18,5 se observó una reducción del tamaño, apreciable a simple vista, de los embriones KO comparado con sus hermanos WT (Fig. 52 A). Esta diferencia de tamaño se fue haciendo más acusada durante la edad postnatal y adulta (Fig. 52 B, C y E). La reducción de tamaño corporal, se ve reflejada en una disminución del peso del animal, siendo a P5 el peso medio de los ratones KO 2,67 veces menor que el de los WT, a P21 de 3,5 veces ($P<0,001$) y a P49 3,86 veces ($P<0,001$) (Fig. 52 G). El peso de los animales heterocigotos fue similar al de los WT. Esta reducción del tamaño somático en animales KO va acompañada de una reducción del tamaño cerebral, aunque las estructuras cerebrales están conservadas (Fig. 52 D y F). En el HP se observó una disminución del volumen total, tanto del GD y como del Asta de Ammón de manera proporcional (Fig. 53 A-C y E-G, Tabla 42). Además, el área de la capa de células grano fue menor en los animales

KO que en los animales WT (a P21 fue de 1,49 veces menor, $P<0,05$; y a P49 1,43 veces, $P<0,01$) (Fig. 53 D y H).

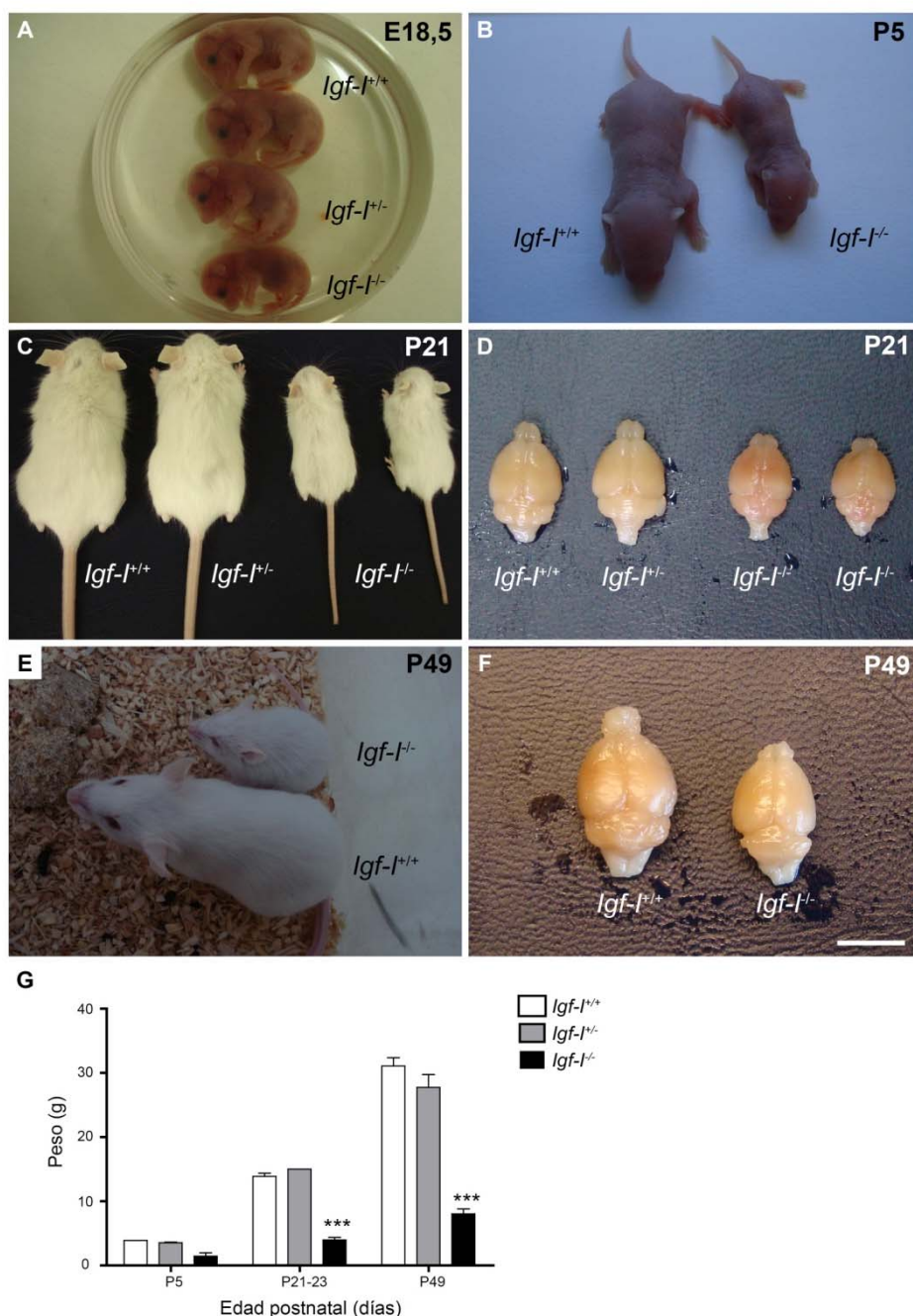


Figura 52: Efecto de la delección global de *Igf-I* en el crecimiento somático del ratón durante el desarrollo embrionario y postnatal-adulto. (A) Imagen de embriones E18,5 *Igf-I*^{+/+}, *Igf-I*^{+/-} e *Igf-I*^{-/-}. Se puede apreciar la disminución de tamaño de los animales KO. (B) La fotografía muestra animales P5 *Igf-I*^{+/+} e *Igf-I*^{-/-}. Los animales KO presentan una disminución de tamaño más acusada que en edades embrionarias. (C y E) Fotografías de animales P21-23 y P49 *Igf-I*^{+/+}, *Igf-I*^{+/-} e *Igf-I*^{-/-} en la que se puede observar que la disminución de tamaño corporal de los animales KO se hace más acusada con la edad. (D y F) Fotografía del encéfalo y extremo cervical de la médula espinal de animales P21-23 y P49 *Igf-I*^{+/+}, *Igf-I*^{+/-} e *Igf-I*^{-/-}. Los animales KO también presentaron una disminución del tamaño cerebral. (G) La gráfica muestra el peso que presentaron los animales *Igf-I*^{+/+}, *Igf-I*^{+/-} e *Igf-I*^{-/-} a edades P5, P21-23 y P49. Los resultados son la media \pm SEM de 2-8 animales. *** $P<0,001$ (t de Student). Barra de escala (F) = A, 13,5 mm; B 14,81mm; C, 26 mm; D, 7,9 mm; E, 15,74 mm; F, 5,97 mm.

Tabla 42: Reducción del volumen del HP del ratón KO		
Región	P21	P49
HP	1,5 veces	2,34 veces
GD	1,6 veces	2,36 veces
CA	1,4 veces	2,35 veces

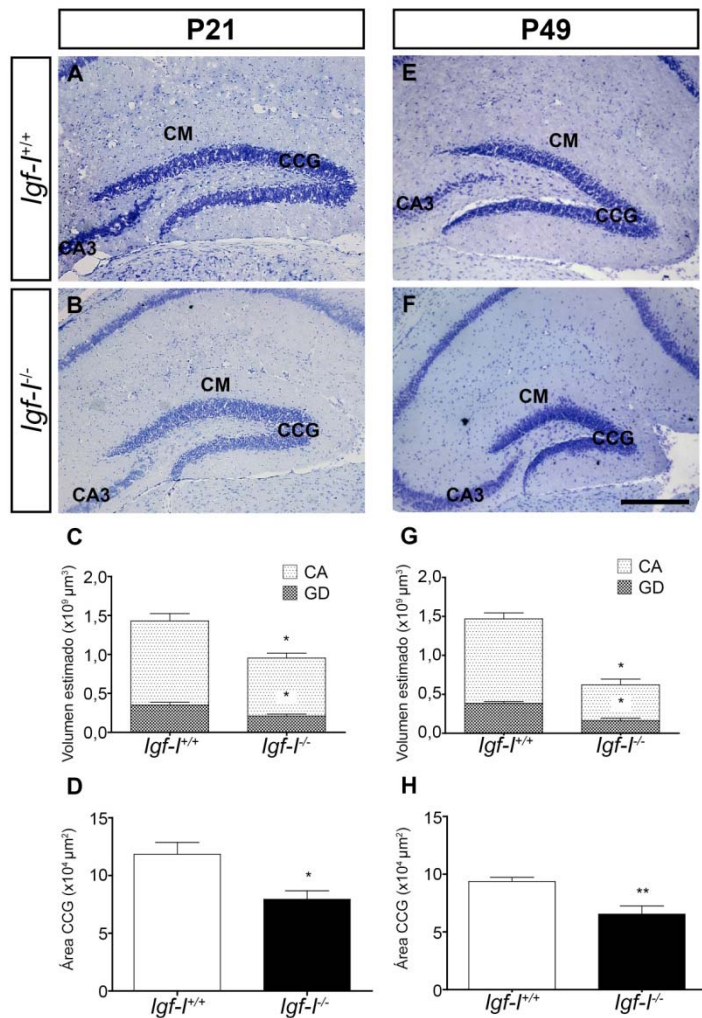


Figura 53: La falta de IGF-I provoca una disminución del tamaño del hipocampo en animales postnatales y adultos. Secciones coronales de animales de edad P21 y P49 WT y KO para IGF-I fueron teñidas con violeta de cresilo. Sobre ellas se estimó el volumen del hipocampo (GD y CA) con el programa Stereoinvestigator y se calculó el área de la CCG. (A-B y E-F) Las fotografías de secciones teñidas con violeta de cresilo reflejan que la estructura general del GD está preservada en ambos genotipos. (C y G) Los gráficos muestran la estimación del volumen del hipocampo (dividido en GD y CA) en animales WT y KO. (D y H) Los gráficos indican el área de la CCG en secciones coronales de animales WT y KO. Los resultados son la media ± SEM de 4-14 animales por genotipo. *P< 0,05, **P< 0,01 (t de Student). Barra de escala (F) = 558 μm. CCG=capa de células grano, CM=capa molecular.

4.3. Papel de IGF-I durante la proliferación celular *in vivo*

Debido a la expresión de IGF-I y su receptor en el HP y al menor tamaño de éste en los animales KO para IGF-I comparado con los animales WT, nos planteamos estudiar en profundidad el papel de IGF-I durante las distintas fases de la neurogénesis postnatal y adulta en el GD (ver Fig. 18 de Material y Métodos)

Para estudiar el efecto de la falta de IGF-I en las células proliferativas, inmunoteñimos secciones de animales WT y KO P49 con dos marcadores de proliferación, BrdU que marca las células que se encuentran en fase S del ciclo celular (en animales inyectados con BrdU 2h antes del sacrificio), y P-Histona H3 que marca las células en mitosis (Hurtado-Chong et al. 2009; Mendez-Gomez y Vicario-Abejon 2012) (Fig. 54). Encontramos células BrdU⁺ en la ZSG del GD, sin observar

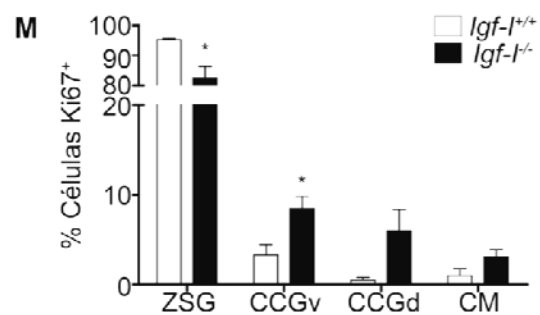
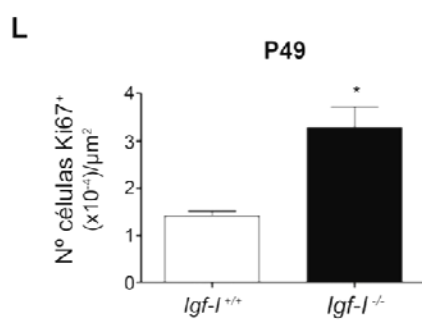
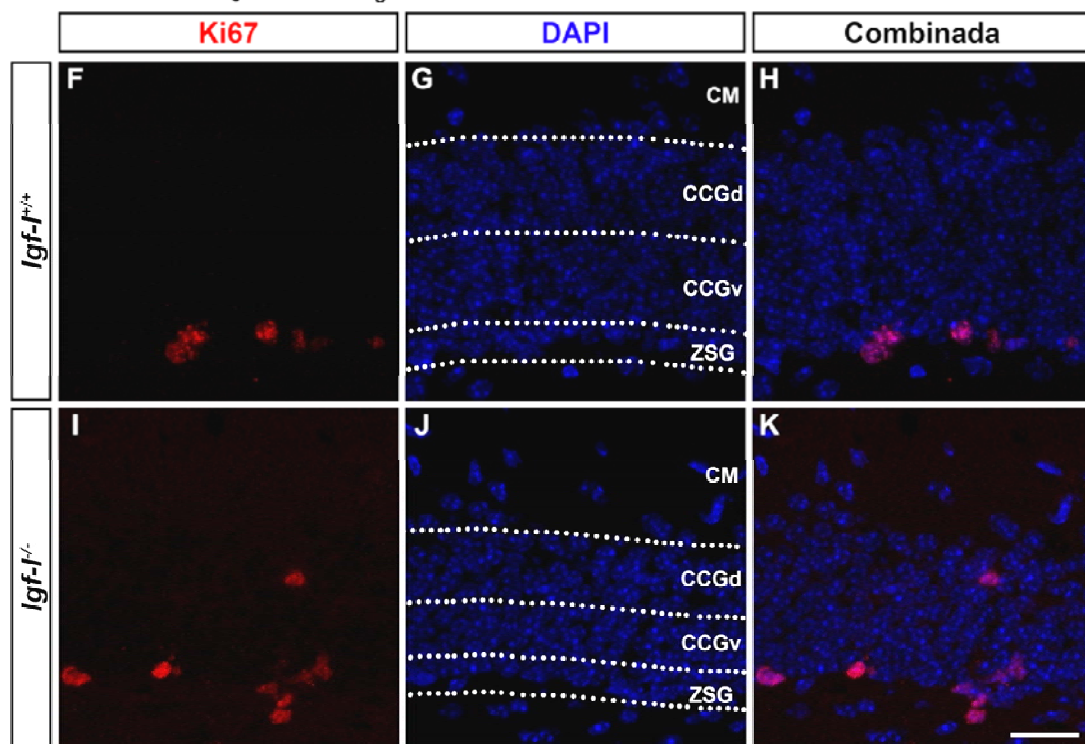
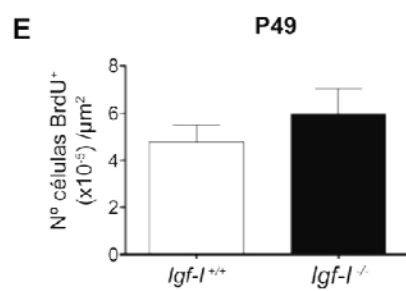
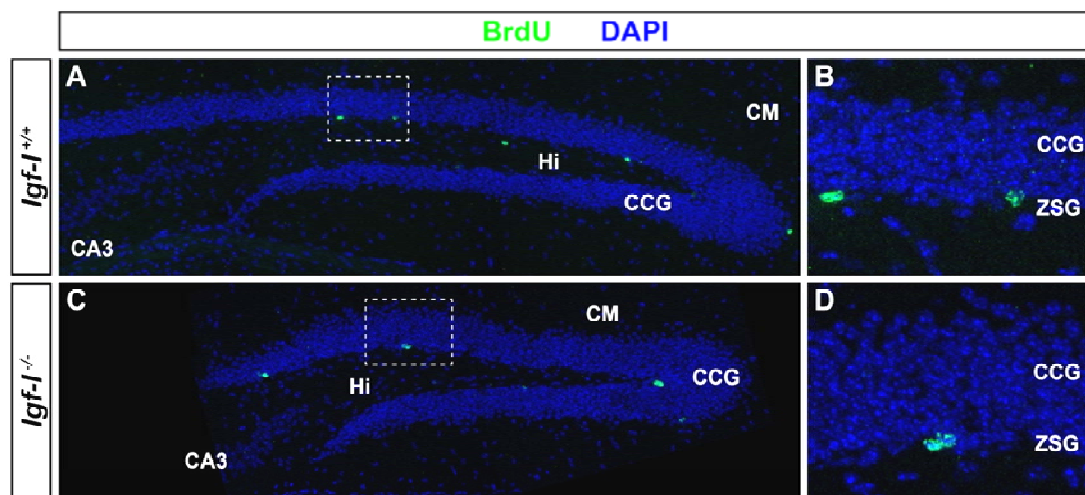


Figura 54: Análisis del número de células BrdU⁺ y Ki67⁺ en ratones *Igf-1^{+/+}* y *Igf-1^{-/-}*. Secciones coronales de ratones WT y KO de edad P49 fueron inmunoteñidas contra BrdU o Ki67 y teñidas con DAPI. **(A-D)** Imágenes representativas de secciones del GD, inmunoteñidas con anti-BrdU, de animales WT y KO que recibieron un pulso de BrdU de 2 h (inyección intraperitoneal) para marcar las células en fase S. En B y D se observan a mayor aumento las células BrdU⁺. **(E)** En el gráfico se representa el número de células BrdU⁺ por área en animales WT y KO P49. **(F-K)** Imágenes de la CCG representativas de secciones de animales WT y KO inmunoteñidas con anti-Ki67 para marcar las células en ciclo. **(L)** El gráfico muestra el número de células Ki67⁺ por área en animales WT y KO. **(M)** El gráfico muestra la distribución de las células Ki67⁺ en las distintas capas del GD en animales WT y KO. Los resultados son la media \pm SEM de 4-5 animales por genotipo. Barra de escala (K) = A y C, 96,5 μ m; B y D, 28,74 μ m; F-K, 22 μ m. *P< 0,05 (t de Student). CCGd=capa de células grano, área dorsal; CCGv=capa de células grano, área ventral; CCG=capa de células grano; CM=capa molecular; Hi= hilus; ZSG=zona subgranular.

diferencias significativas entre los animales WT y los KO en cuanto al número de células por área de la CCG (Fig. 54 A-E). Las células P-Histona H3⁺ también se localizaron en la ZSG pero el número de células positivas por sección fue muy reducido en ambos genotipos, lo que hizo muy difícil su cuantificación (dato no mostrado).

Además, teñimos secciones con Ki67 que marca las células proliferativas en cualquier fase del ciclo celular, a excepción de las células quiescentes (Tanaka et al. 2011). Cuando analizamos secciones de animales WT observamos que las células Ki67⁺ se localizan mayoritariamente en la ZSG (Fig.54 F-H y M). Sin embargo, los animales KO para IGF-I presentan una acumulación de células Ki67⁺ por sección (incremento en el número de células Ki67⁺ del 56,25%, P<0,05), cuya distribución fue distinta a la de los animales WT. Así, en los animales KO se observó una disminución del 13,6% en la ZSG (P<0,05) y un aumento de 2,5 veces en la CCGv (P<0,05), de 12,7 veces en la CCGd (P=0,1) y de 3,1 veces en la CM (P=0,1) (Fig. 54 I-M).

Nuestros resultados muestran que la falta de IGF-I *in vivo* aumenta el número de células progenitoras en ciclo, sin afectar su división celular.

4.4. Efecto de IGF-I en la proliferación y autorrenovación celular *in vitro*

Para profundizar en el papel de IGF-I en la proliferación celular en el HP, realizamos cultivos de CMHP de ratones postnatales WT y KO que se crecieron como neurosféricas.

En primer lugar, analizamos la proliferación en cultivos poblacionales. Para lo cual, tras disociar las neurosféricas, determinamos mediante el marcaje con IP el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular por citometría de flujo. Los cultivos de CMHP de animales KO presentaron la misma proporción de células en cada una de las fases del ciclo celular que los cultivos de CMHP de WT (Fig. 55).

A continuación, quisimos analizar la proliferación celular sólo en aquellas células que formaron neurosféricas, para lo cual recogimos y fijamos las neurosféricas y, posteriormente, las inmunoteñimos con un anticuerpo contra BrdU (pulso de BrdU 30 min antes de la fijación) y Ki67. Además, algunos cultivos de WT y KO fueron incubados con IGF-I (200 ng/ml) en condiciones saturantes con el objetivo de revertir la falta de IGF-I en las células obtenidas a partir de animales KO (Fig. 56). En todas las condiciones, la inmensa mayoría de las células de las neurosféricas expresaron los marcadores de CMN Nestina y Sox2 (ver insertos). Las neurosféricas de cultivos KO presentaron

una reducción, no significativa, del volumen del 33,5% comparado con las de los cultivos WT ($P=0,16$), que se compensó al añadir IGF-I ($P<0,05$) (Fig. 56 E). Además, las neurosféricas en los cultivos de animales KO estaban formadas por un menor número de células DAPI⁺ comparado con las neurosféricas WT (disminución del 41,85%, $P<0,05$) aunque alcanzaron valores similares a las WT al ser cultivados con IGF-I ($P=0,06$) (Fig. 56 F). Sin embargo, el número de células Ki67⁺ y BrdU⁺ fue similar en todas las condiciones. Adicionalmente, las neurosféricas obtenidas de animales KO poseían un mayor porcentaje de células Ki67⁺ y BrdU⁺ comparado con las neurosféricas del cultivo WT (incremento del 29,14%, $p<0,05$), porcentajes que disminuían al añadir IGF-I (Ki67, $P=0,17$, no significativo; BrdU, $P<0,05$) (Fig. 56 G). IGF-I también produjo una disminución del 25-40% en los porcentajes de células Ki67⁺ ($P<0,05$) y BrdU⁺ ($P=0,09$, no significativo) en los cultivos WT (Fig. 56 G). Además, se observó un aumento significativo ($P<0,01$) de los porcentajes de células Ki67⁺ y BrdU⁺ en los cultivos KO comparado con los WT cuando ambos eran tratados con IGF-I (Fig. 56 G). Estos resultados sugieren que la falta de IGF-I incrementa el número de células BrdU⁺ y Ki67⁺ en las neurosféricas, efecto que puede ser compensado con la adición de IGF-I exógeno.

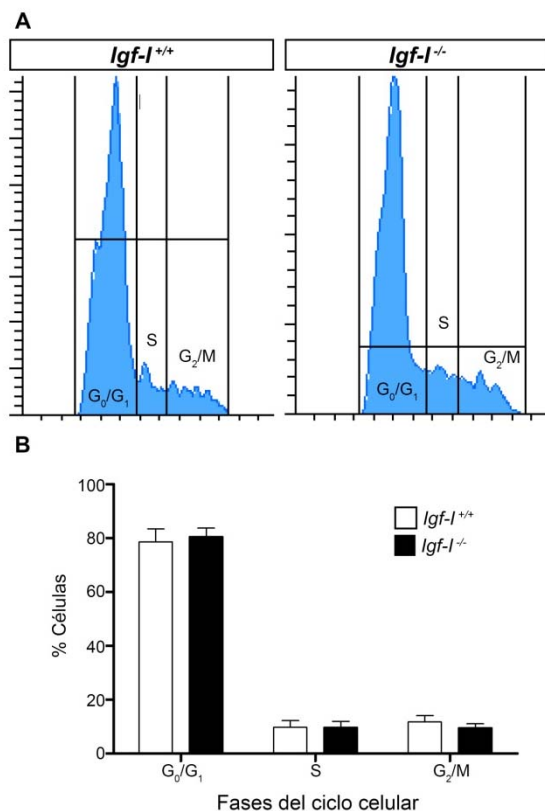


Figura 55: Análisis del ciclo celular en CMHP. Las CMHP fueron obtenidas a partir de ratones WT y KO P21 y crecidas como neurosféricas. Para analizar el ciclo celular por citometría de flujo, las neurosféricas fueron disgregadas y las células teñidas con IP. **(A)** Perfiles de ciclo representativos de CMHP WT y KO en el que se marcan el contenido de ADN en las distintas fases del ciclo celular. **(B)** En el gráfico se representa el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo en cultivos de animales WT y KO. Los resultados son la media \pm SEM de 3-4 experimentos por genotipo. IP=ioduro de propidio.

Por último, analizamos el efecto de IGF-I en la autorrenovación y proliferación de CMHP mediante un análisis clonal. Para lo cual, se sembró una única célula por pocillo en placas de 96 pocillos y las células se mantuvieron en cultivo con factores de crecimiento durante 14 días (Fig. 57). El número de células únicas analizadas fue similar en cultivos de ambos genotipos (45-30%); de las cuales, un 28,66% y un 39,80% en los cultivos WT y KO, respectivamente ($P=0,36$), fueron capaces de sobrevivir durante 14 días y generar clones que contenían distinto número de células. Dichos clones se clasificaron en grupos en función del número de células que contenía (una célula, dos células, de cuatro a ocho células y más de ocho). En los cultivos de CMHP WT y KO se encontró el mismo

porcentaje de clones en cada uno de estos grupos que en los cultivos WT. Sin embargo, las neurosféricas, grupos de más de ocho células (Vicario-Abejón et al. 2003), en los cultivos KO para *Igf-1* presentaron tamaños 2,53 veces mayores que las neurosféricas de los cultivos WT ($P<0,05$; Fig. 57 C). Estos resultados sugieren que la falta de IGF-I no altera la capacidad de autorrenovación de las CMHP aunque sí aumenta su proliferación en cultivo.

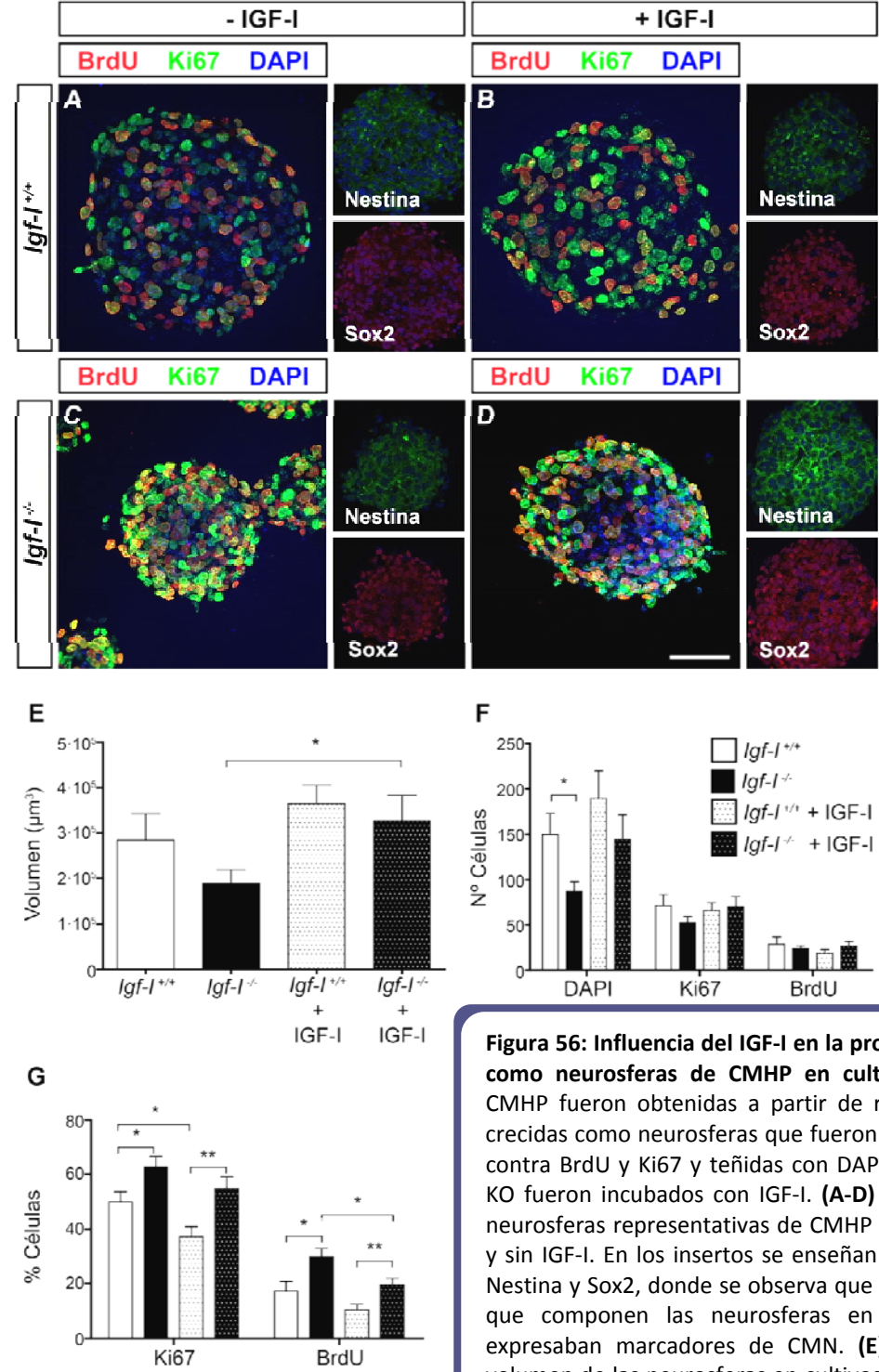


Figura 56: Influencia del IGF-I en la proliferación y crecimiento como neurosféricas de CMHP en cultivos poblacionales. Las CMHP fueron obtenidas a partir de ratones WT y KO P21 y crecidas como neurosféricas que fueron fijadas e inmunoteñidas contra BrdU y Ki67 y teñidas con DAPI. Algunos cultivos WT y KO fueron incubados con IGF-I. (A-D) Las imágenes muestran neurosféricas representativas de CMHP WT y KO, cultivados con y sin IGF-I. En los insertos se enseñan inmunotinciones contra Nestina y Sox2, donde se observa que la mayoría de las células que componen las neurosféricas en todas las condiciones expresaban marcadores de CMN. (E) El gráfico muestra el volumen de las neurosféricas en cultivos WT y KO, con o sin IGF-I. Los gráficos representan el número de células DAPI⁺, BrdU⁺ y Ki67⁺ (F) y el porcentaje de células BrdU⁺ y Ki67⁺ (G), en un plano de confocal, en cultivos WT y KO crecidos en ausencia o presencia de IGF-I. Los resultados son la media \pm SEM de 15-20 neurosféricas de 4 experimentos por genotipo. * $P<0,05$, ** $P<0,01$ (t de Student). Barra de escala (D) = 50,85 μm ; insertos=32,5 μm .

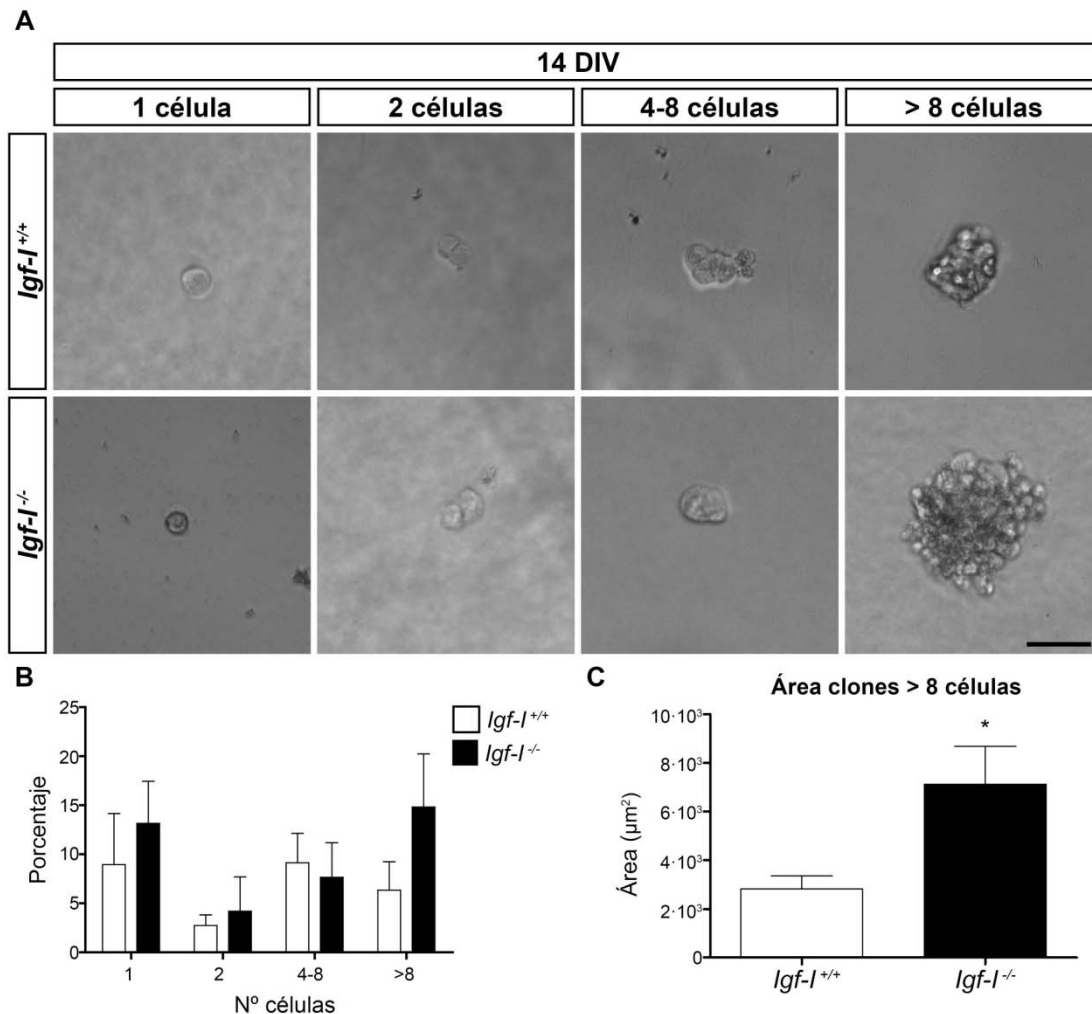


Figura 57: Influencia del IGF-I en la autorrenovación y proliferación celular de CMHP en cultivos clonales. Las CMHP fueron obtenidas a partir de ratones WT y KO P21 y sembradas como célula única en condiciones clonales. **(A)** Las imágenes muestran las CMHP en distintos estadios tras 14 días en cultivo. **(B)** El gráfico muestra el porcentaje de células únicas que habían dado lugar a 1 célula, 2 células, 4-8 células o más de 8 células tras 14 DIV en cultivos de CMHP WT y KO. Los resultados son la media \pm SEM de 4 cultivos por genotipo. **(C)** El gráfico indica el área media por neurosfera (más de ocho células) en cultivos WT y KO. Los resultados son la media \pm SEM de 9-16 neurosféricas de 4 cultivos. * $P < 0,05$ (t de *Student*). Barra de escala (A) = 46,88 μ m.

4.5. Papel de IGF-I durante la formación de neuronas a partir de CMN *in vivo*

La neurogénesis hipocampal tiene lugar siguiendo una secuencia génica y celular que va desde la CMN hasta la neurona grano madura (Roybon et al. 2009; Encinas et al. 2011; Hodge et al. 2012). Basándonos en esta secuencia descrita (ver Fig. 5 de la Introducción y Fig. 18 de Material y Métodos), estudiamos el impacto de la falta de IGF-I en los distintos estadios celulares que se producen durante la neurogénesis. Así, realizamos inmunohistoquímicas para marcadores específicos en secciones coronales de ratones postnatales (P21-24) y/o adultos (P54) WT y KO para IGF-I.

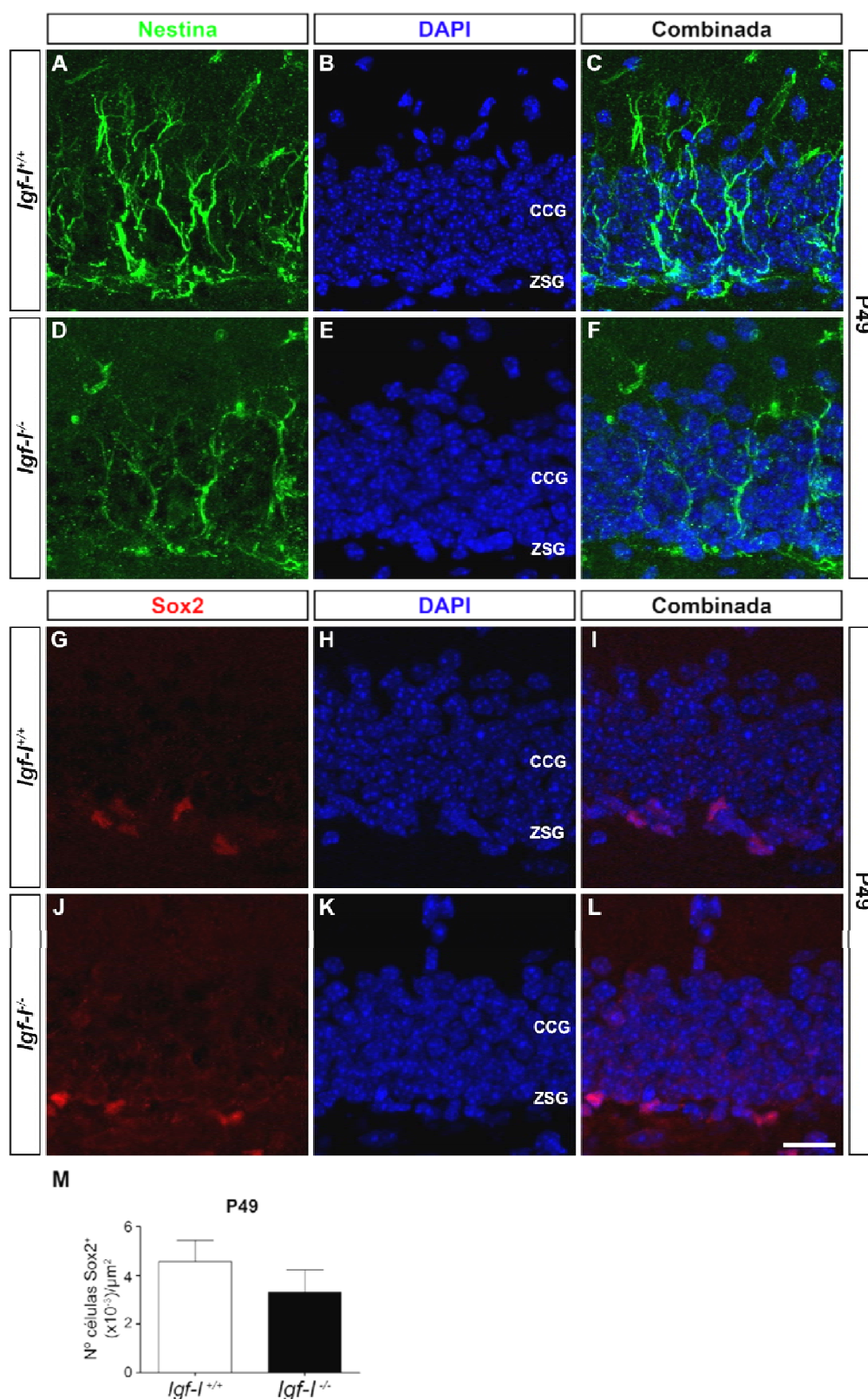


Figura 58: Efecto de la delección de *Igf-I* en el mantenimiento de las células madre neurales *in vivo*. Secciones coronales de ratones P49 WT y KO fueron inmunoteñidas con anticuerpos contra Nestina o Sox2 para marcar las CMN y teñidas con DAPI. (A-F) Imágenes representativas de la CCG de secciones de animales P49 WT y KO donde se observa que las células Nestina⁺ en los animales KO poseen una morfología menos compleja. (G-L) Fotografías de la CCG de animales P49 WT y KO inmunoteñidas contra Sox2. Se detectaron células Sox2⁺ en la ZSG. (M) El gráfico muestra el número de células Sox2⁺ por área en el GD de animales WT y KO. Los resultados son la media \pm SEM de 6 animales por genotipo. Barra de escala (L) = 22 μ m. CCG=capa de células grano, ZSG=zona subgranular.

4.5.1. Efecto de IGF-I en células madre del hipocampo

Para analizar el efecto de IGF-I en células madre *in vivo*, teñimos secciones de animales adultos (P49) WT y KO con anticuerpos contra nestina y Sox2 (McKay 1997; Suh et al. 2007; Hodge et al. 2012) (Fig. 58). Los animales KO presentaron células nestina⁺ en el GD con una morfología menos compleja que los animales WT, ya que las prolongaciones de las células nestina⁺ en los animales WT alcanzaban la CM, mientras que en los animales KO las prolongaciones se encontraban principalmente dentro de la CCG penetrando ligeramente en la CM (Fig. 58 A-F). Además, en los animales KO se encontró una reducción, no significativa, del 32,54%, ($P=0,35$) en el número de células Sox2⁺ localizadas mayoritariamente en la ZSG (Fig. 58 M).

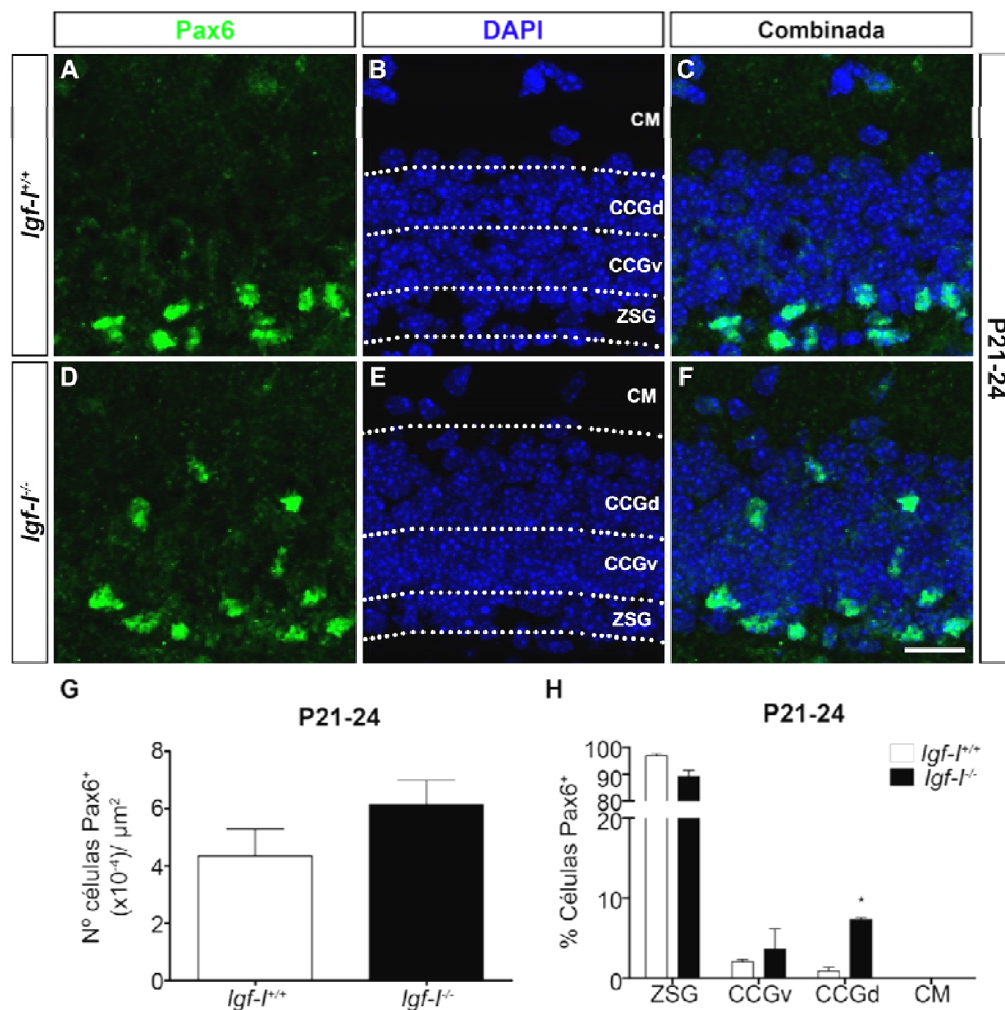


Figura 59: Influencia del IGF-I sobre la población de células progenitoras Pax6⁺ en el GD de animales P21-24. Secciones coronales de ratones P21-24 WT y KO fueron inmunoteñidas con anti-Pax6 y teñidas con DAPI. **(A-F)** Las imágenes representativas de secciones de animales P21-24 WT y KO muestran la distribución de las células Pax6⁺ en el CCG. **(G)** En el gráfico se representa el número de células Pax6⁺ por área en el GD de animales WT y KO. **(H)** El gráfico muestra la distribución de las células Pax6⁺ en las distintas capas del GD en animales WT y KO. Los resultados son la media ± SEM de 4 animales por genotipo. Barra de escala (F) = 22 μm. CCGd=capa de células grano, área dorsal; CCGv=capa de células grano, área ventral; CM=capa molecular; ZSG=zona subgranular.

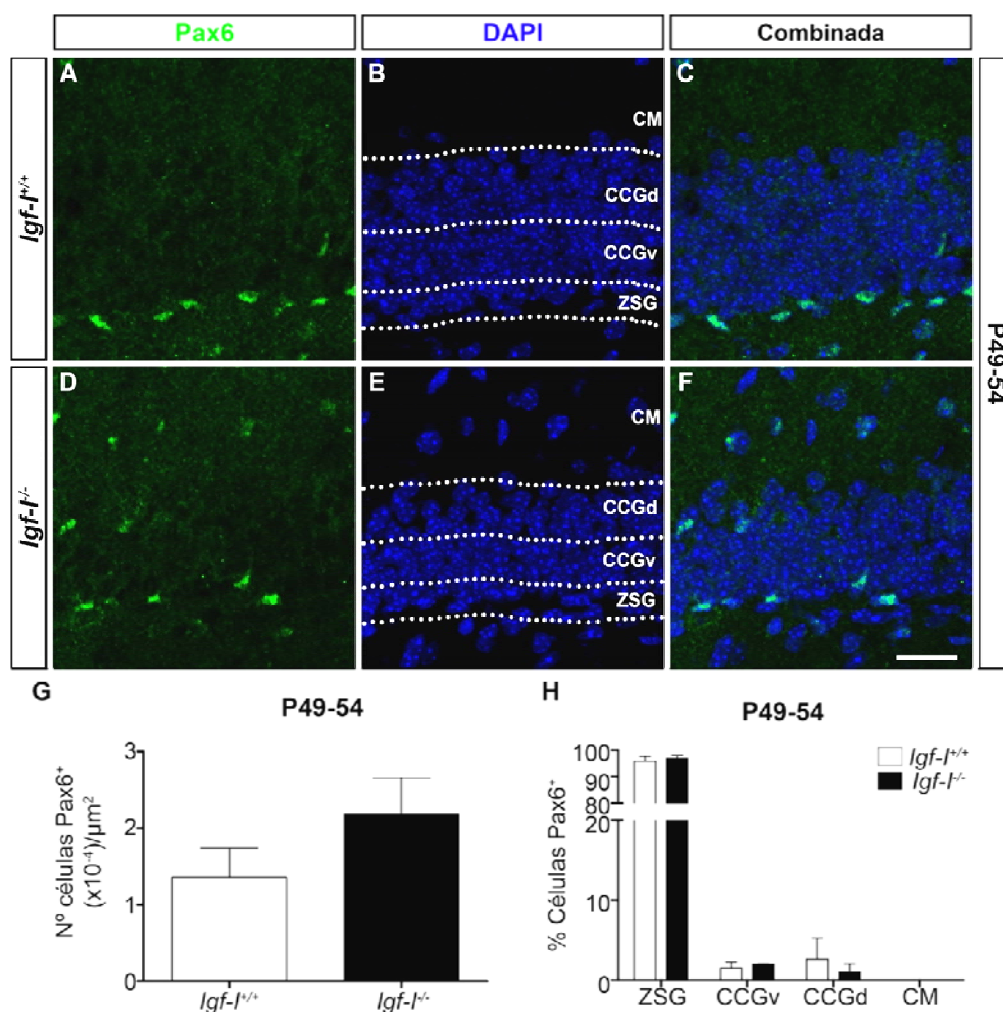


Figura 60: Influencia del IGF-I sobre la población de células progenitoras Pax6⁺ en el GD de animales P49-54. Secciones coronales de ratones P49-54 WT y KO fueron inmunoteñidas con anti-Pax6 y teñidas con DAPI. **(A-F)** Imágenes representativas de la CCG en las que se observa la presencia de células Pax6⁺. **(G)** El gráfico muestra el número de células Pax6⁺ por área en el GD de animales WT y KO. **(H)** En el gráfico se representa la distribución de las células Pax6⁺ en las distintas capas del GD en animales WT y KO. Los resultados son la media ± SEM de 3 animales por genotipo. Barra de escala (F) = 22 μm. CCGd=capa de células grano, área dorsal; CCGv=capa de células grano, área ventral; CM=capa molecular; ZSG=zona subgranular.

4.5.2. Papel de IGF-I en progenitores, neuronas inmaduras y neuronas grano

Pax6 es un factor de transcripción de la familia *Paired box* necesario para el desarrollo del SNC (Walther y Gruss 1991; Díaz-Guerra et al. 2013). En el GD se expresa en células madre y en progenitores aún no determinados a formar neuronas o glia (Hodge et al. 2012; Hsieh 2012). Cuando teñimos secciones coronales de ratones WT P21-24 encontramos un incremento del 29,5% (P=0,21, no significativo) en el número de células Pax6⁺ en los animales KO comparado con los animales WT (Fig. 59 A-G). Aunque en ambos animales las células Pax6⁺ se localizaban principalmente en la ZSG, en los animales KO se encontró un incremento de 8,3 veces en el número de células Pax6⁺ en la zona más externa de la CCG (P<0,05) (Fig. 59 A-F y H). Los animales P49-54 KO presentaron un aumento, no significativo, del 38,1% en el número de células Pax6⁺ por sección comparado con los animales WT (P=0,25; Fig. 60 A-G), no observándose diferencias en la distribución de las células en las distintas zonas (Fig. 60 A-F y H). Además, en animales P49-54 encontramos una reducción (~65%) en el

número de células Pax6⁺ tanto en animales WT como KO comparado con animales más jóvenes (P21).

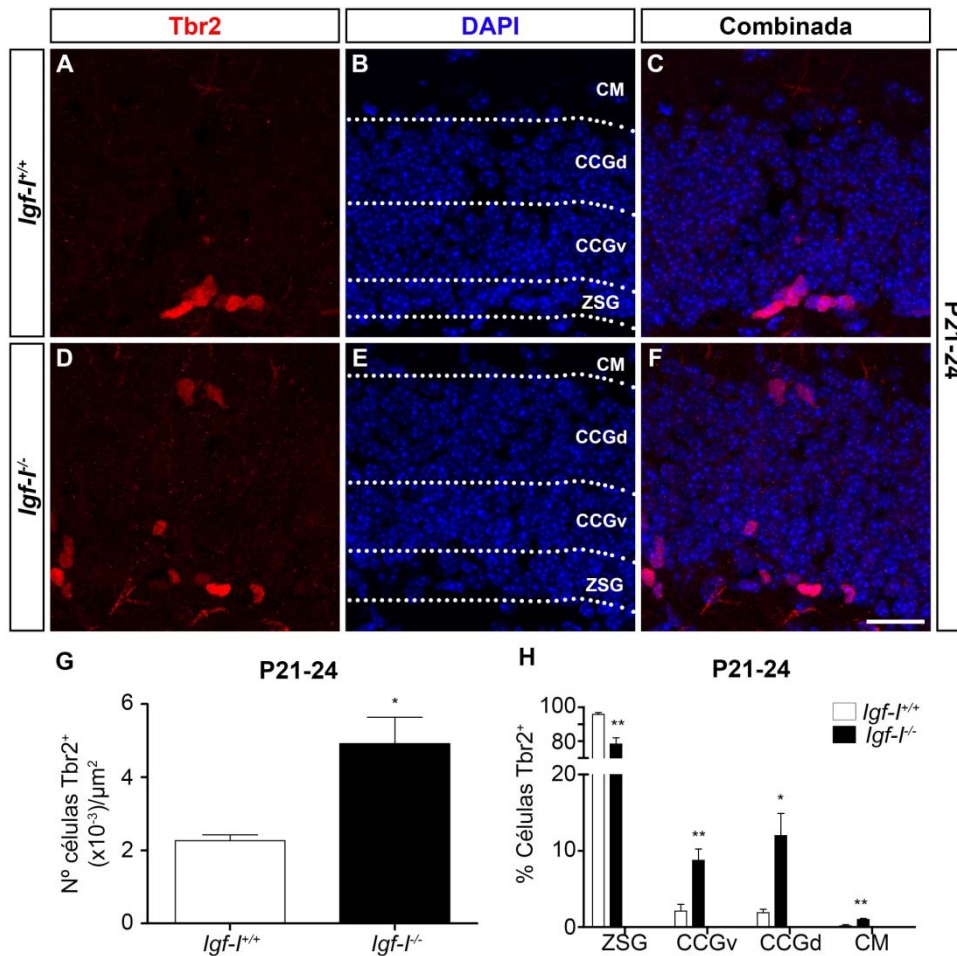


Figura 61: Acumulación de progenitores neuronales Tbr2⁺ en el GD de animales P21-24 *Igf-1*^{-/-}. Secciones coronales de ratones P21-24 WT y KO fueron inmunoteñidas con anti-Tbr2 y teñidas con DAPI. (A-F) Las imágenes representativas de la CCG de secciones de animales WT y KO permiten visualizar las células Tbr2⁺. (G) El gráfico muestra el número de células Tbr2⁺ por área en el GD de animales WT y KO. (H) En el gráfico se representa la distribución de las células Tbr2⁺ en las distintas capas del GD en animales WT y KO P21-24. Se observó una acumulación de progenitores Tbr2⁺ en zonas distintas a la ZSG en los animales KO comparado con los WT. Los resultados se muestran como la media ± SEM de 4 animales por genotipo. *P<0,05, **P<0,01 (t de Student). Barra de escala (F) = 22 μm. CCGd=capa de células grano, área dorsal; CCGv=capa de células grano, área ventral; CM=capa molecular; ZSG=zona subgranular.

Tbr2 forma parte de la familia de genes *T-box* (Bollag et al. 1994). Este factor de transcripción es esencial en el periodo de gastrulación y en el SN es necesario para la correcta formación del telencéfalo dorsal (Díaz-Guerra et al. 2013). En el GD del HP se expresa en progenitores intermedios muy probablemente especificados hacia un linaje neuronal (Hodge et al. 2012; Hsieh 2012). En animales postnatales P21-24, observamos un incremento del 55,10 % en el número de células Tbr2⁺ en animales KO comparado con los WT (P<0,05; Fig. 61 A-G). Además, en los animales KO se detectaron células Tbr2⁺ en la CCG y en la CM en porcentajes mayores que en los animales WT (P<0,05 y P<0,01), así como un menor porcentaje en la ZSG (P<0,01) (Fig. 61 A-F y H). Este acúmulo se mantuvo en los animales KO P49-54 (incremento del 47,88%, P<0,05; Fig. 62 A-G) aunque no se

observaron diferencias significativas en su distribución en el GD (Fig. 62 H). Además, en animales WT y KO P49-54 se observó una disminución ($\approx 50\%$) de las células $Tbr2^+$ comparado con los animales P21-23.

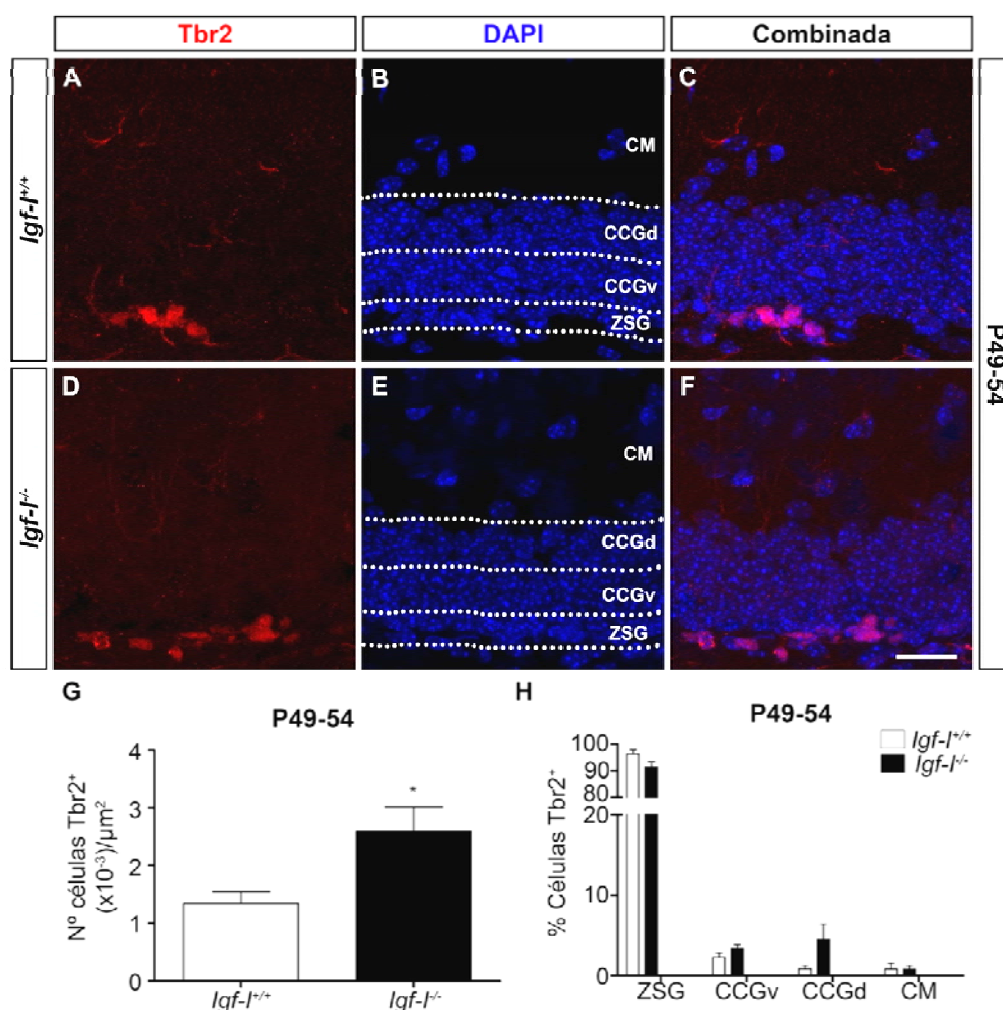


Figura 62: Acumulación de progenitores neuronales $Tbr2^+$ en el GD de animales P49-54 $Igf-1^{-/-}$. Secciones coronales de ratones P49-54 WT y KO fueron inmunoteñidas con anticuerpos contra $Tbr2$ y teñidas con DAPI. (A-F) Imágenes representativas de la CCG de secciones donde se observan células $Tbr2^+$. (G) El gráfico muestra el número de células $Tbr2^+$ por área en el GD de animales WT y KO. (H) En el gráfico se representa la distribución de las células $Tbr2^+$ en las distintas capas del GD en animales WT y KO. Los animales KO poseen un incremento de progenitores $Tbr2^+$ en el GD comparado con los animales WT. Los resultados son la media \pm SEM de 4 animales por genotipo. * $P < 0,05$ (t de Student). Barra de escala (F) = 22 μm . CCGd=capa de células grano, área dorsal; CCGv=capa de células grano, área ventral; CM=capa molecular; ZSG=zona subgranular.

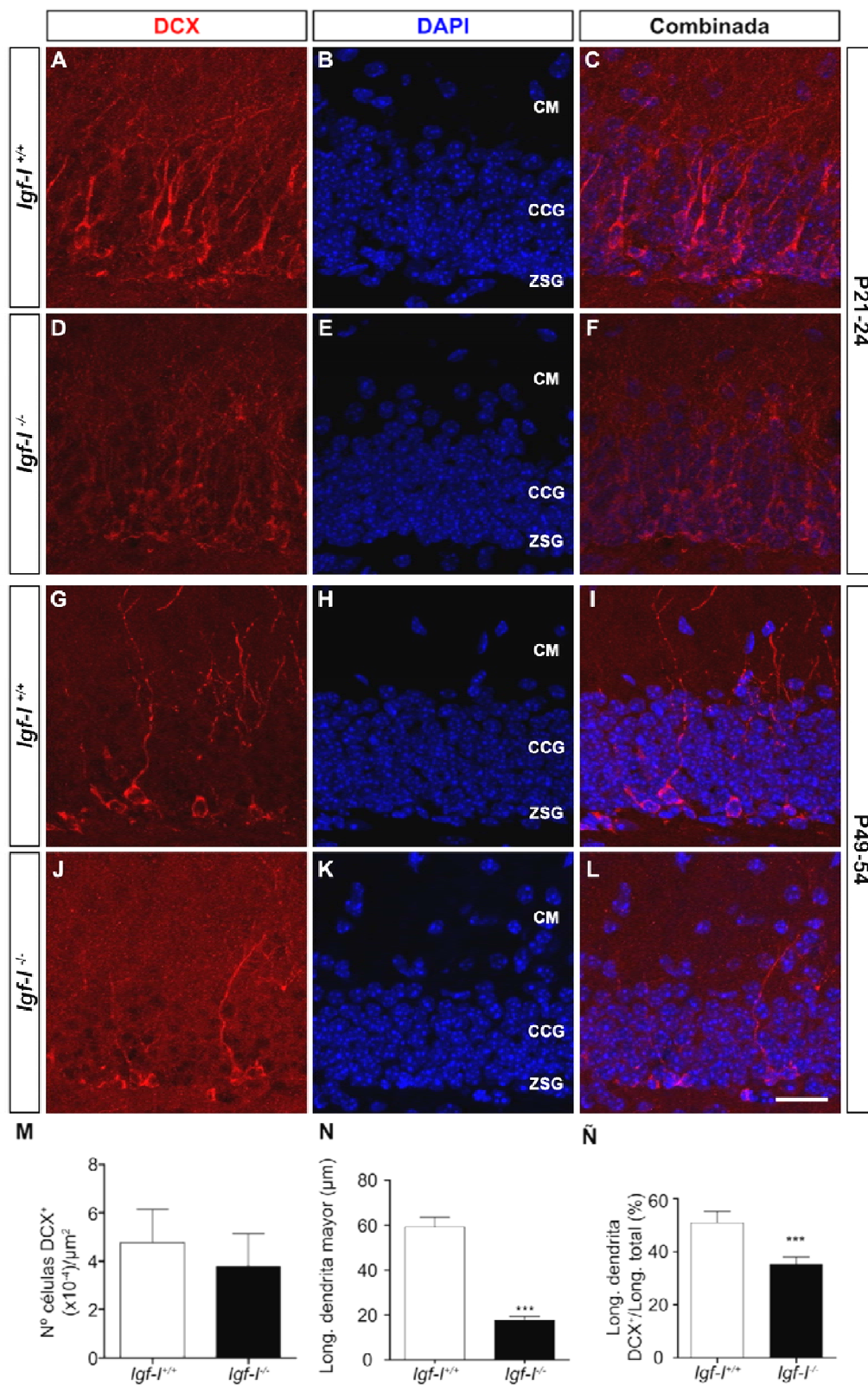
Para detectar el citoplasma y las dendritas de neuroblastos migratorios y neuronas inmaduras utilizamos el marcaje contra doblecortina (DCX). Esta es una proteína asociada a microtúbulos que se expresa casi en exclusiva en neuronas inmaduras durante su proceso de migración (Gleeson et al. 1999). Su expresión empieza después de la salida de ciclo celular y continúa 2-3 semanas hasta que la célula madura. En secciones coronales de animales WT y KO P21-24, se observa una expresión abundante de DCX (Fig. 63 A-F), aunque el marcaje es marcadamente menor en los KO cuando lo comparamos con sus hermanos WT. En animales más mayores (P49-54), se

observó una gran reducción en el número de células DCX⁺ en ambos genotipos (Fig. 63 G-L). Aunque los animales WT y KO presentaron números similares de células DCX⁺, la morfología de estas células en los KO resultó ser menos compleja que en los animales WT. Como puede verse en la figura, el árbol dendrítico de las células DCX⁺ llega hasta la CM en los animales WT, mientras que en los animales KO las dendritas de las células DCX⁺ sólo se adentraban ligeramente en la CM. Esta menor complejidad morfológica, se reflejaba en una menor longitud de la dendrita principal en las neuronas de los animales KO (disminución de 3,34 veces, $P < 0,001$; Fig. 63 N) que no se debió al menor tamaño del animal, como muestra el porcentaje de la longitud de las dendritas DCX⁺ con respecto a la longitud desde la ZSG hasta la fisura hipocampal ($P < 0,01$, Fig. 63 Ñ).

Las células grano maduras del GD del HP, se caracterizan por la expresión de Prox1, un factor de transcripción de tipo *homeobox* (Galeeva et al. 2007; Iwano et al. 2012). En los animales WT las células Prox1⁺ forman una CCG perfectamente delimitada, observable tanto a P21-24 como a P54 (Fig. 64 A-B y E-F). Sin embargo, en los animales KO los límites que forman las células Prox1⁺ no están tan bien definidos, dando lugar a una CCG más desorganizada (Fig. 64 C-D y G-H). Para cuantificar esta desorganización, trazamos una línea delimitando la CCG y realizamos un recuento de las células Prox1⁺ que quedaban fuera de esa línea en ambos genotipos (células ectópicas). Encontramos un incremento de 2,23 veces en el número de células Prox1⁺ ectópicas en los animales KO P21-24 comparado con los animales WT ($P < 0,05$; Fig. 64 I). De igual manera, los animales KO P49-54 mostraron un aumento de 1,9 veces en el número de células Prox1⁺ localizadas fuera de la CCG comparado con los WT ($P < 0,05$; Fig. 64 J). Además quisimos analizar esta desorganización de la CCG mediante gráficos lineales, obtenidos con el análisis de imágenes de microscopía confocal, que mostrasen la intensidad de fluorescencia de la inmunotinción desde la zona del hilus hasta la CM, pasando por la CCG (Fig. 65). En estos gráficos, se pudo observar como en los animales WT la señal de fluorescencia se agrupa en una franja restringida que, posiblemente, se corresponde con la ZSG y la CCG ($\approx 60 \mu\text{m}$, Fig. 65 A). Sin embargo, en los animales KO, además de esta franja, se observan otros picos de fluorescencia debidos a la presencia de células ectópicas (Fig. 65 B).

Finalmente, en la gráfica de la Figura 66, se muestra un resumen de los principales resultados obtenidos del análisis de los distintos marcadores celulares utilizados para determinar el efecto de la carencia de IGF-I en las fases secuenciales de la neurogénesis en ratones adultos (P49-54). Se observa como la falta de *Igf-I* en los ratones KO provoca un acúmulo de células Ki67⁺ (células en ciclo), en parte debido al aumento de progenitores neuronales Tbr2⁺ que poseen estos animales comparado con sus hermanos WT. Además, en los animales KO se encontró un mayor número de células ectópicas Prox1⁺ posicionadas fuera de la CCG. Resultados similares se obtuvieron en animales jóvenes (P21-24), que, al igual que los P49-54, también presentaron una reducción de la longitud de la dendritas de las neuronas DCX⁺.

Figura 63: Las neuronas inmaduras DCX⁺ tienen una menor complejidad morfológica en el GD de animales *Igf-I*^{-/-}. Secciones coronales de ratones P21-24 y P49-54 WT y KO fueron inmunoteñidas con un anticuerpo contra doblecortina (DCX) y teñidas con DAPI. **(A-L)** Imágenes representativas de la CCG de secciones de animales WT y KO en las que se aprecian las células DCX⁺. Las células DCX⁺ de los animales KO tienen una morfología más inmadura que en los animales WT a ambas edades. **(M)** El gráfico muestra el número de células DCX⁺ por área en el GD de animales P49-54 WT y KO. En los gráficos se indican la longitud media de la dendrita mayor **(N)** y el porcentaje de la longitud de las dendritas DCX⁺ con respecto a la distancia desde la ZSG hasta la fisura hipocampal **(Ñ)** en animales P49-54 WT y KO. Los resultados son la media \pm SEM de 4 animales por genotipo y de 40 neuronas de 4 animales distintos por genotipo. *** $P < 0,001$ (t de Student). Barra de escala (L) = $22 \mu\text{m}$. CCG=capa de células grano, ZSG=zona subgranular.



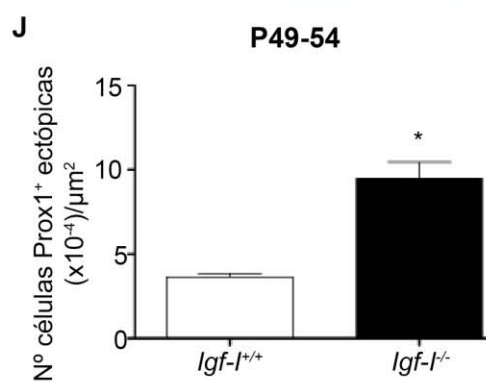
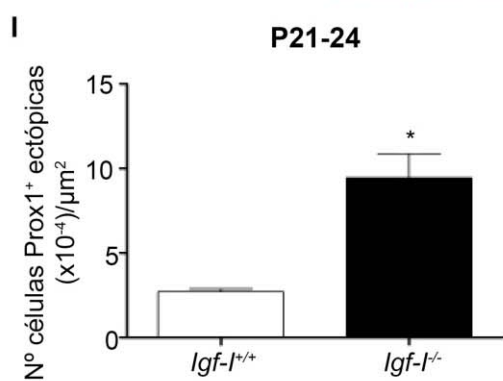
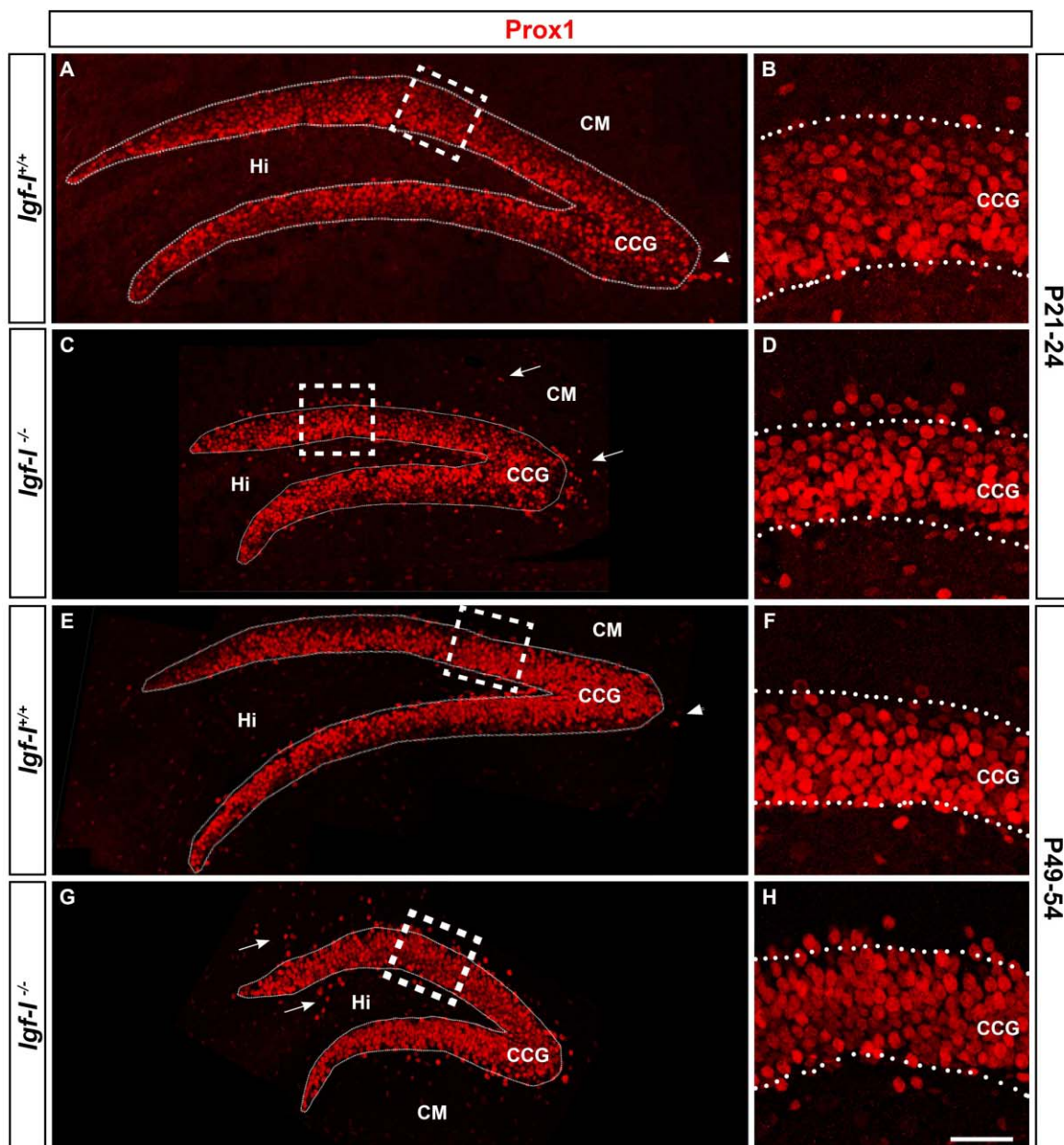


Figura 64: Análisis del posicionamiento ectópico de las neuronas Prox1⁺ en el GD del ratón KO para *Igf-I*. I. Secciones coronales de ratones P21-24 y P49-54 WT y KO fueron inmunoteñidas con anti-Prox1. **(A-D)** Imágenes representativas del GD de animales P21-23 WT y KO. En B y D se muestra a mayor aumento la CCG. **(E-H)** Fotografías de secciones del GD de animales P49 WT y KO inmunoteñidas contra Prox1. En F y H se muestra a mayor aumento la CCG. Las líneas discontinuas delimitan la CCG. **(I y J)** Los gráficos muestran el número de células Prox1⁺ ectópicas (fuera de los límites de la CCG) por área en el GD de animales WT y KO P21-23 y P49-54. El número de células Prox1⁺ desplazadas fuera de la CCG fue mayor en los animales KO que en los WT. Las flechas indican células Prox1⁺ ectópicas en los animales KO. Las cabezas de flecha señalan células Prox1⁺ ectópicas en los animales WT. Los resultados son la media \pm SEM de 3-4 animales por genotipo. *P< 0,05 (t de Student). Barra de escala (H) = A, C, E y G, 59,175 μ m; B, D, F y H 176,25 μ m. CCG=capa de células grano, CM=capa molecular, Hi=Hilus.

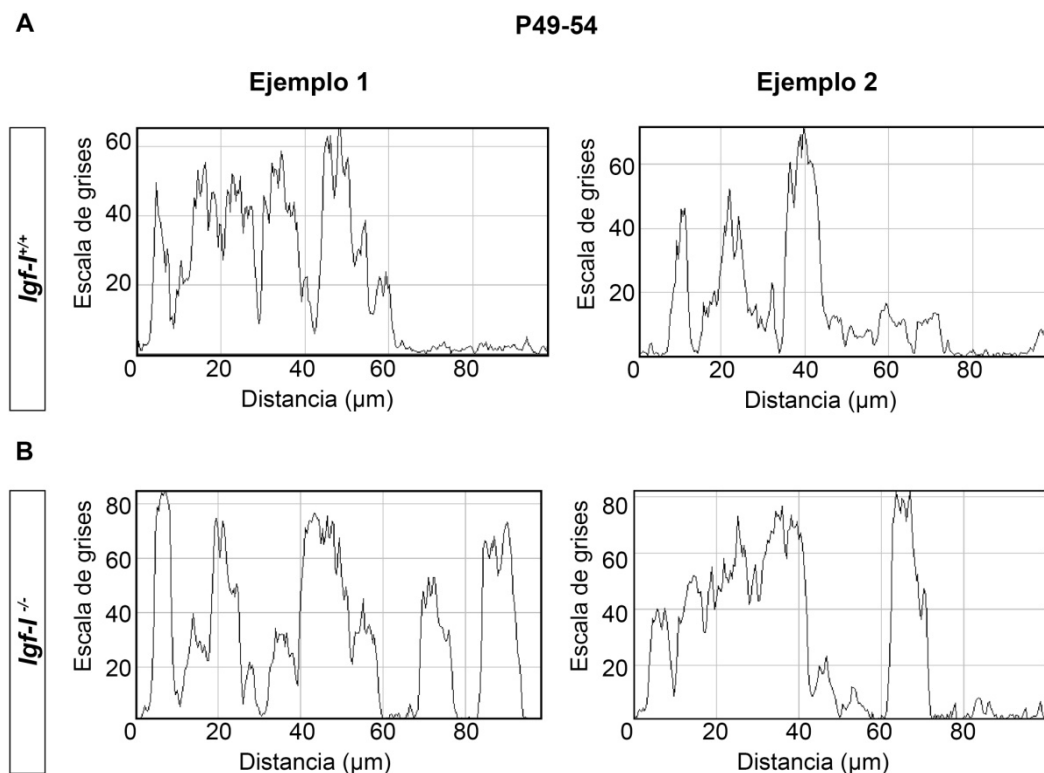


Figura 65: Análisis del posicionamiento ectópico de las neuronas Prox1⁺ en el GD del ratón KO para *Igf-I*. II. Secciones coronales de ratones P49-54 WT y KO fueron inmunoteñidas con Prox1 y se analizó la variación de la intensidad de fluorescencia desde la ZSG hasta la CM del GD con el programa ImageJ. Los gráficos muestran dos ejemplos de los niveles de intensidad en animales WT (A) y KO (B) en perfiles lineales. En los animales WT la intensidad de fluorescencia se agrupa en las primeras 60 μ m, correspondiendo con la CCG. Por el contrario, en los animales KO, además de en esa zona, se observan otros picos de fluorescencia más alejados de la ZSG, posiblemente debidos a la presencia de células Prox1⁺ ectópicas.

A continuación, quisimos descartar que el efecto observado no se debiera a un proceso de gliosis reactiva, inflamatorio o de muerte celular. Para ello, realizamos inmunotinciones contra GFAP para marcar astrocitos, y no encontramos diferencias entre KO y WT en las edades estudiadas (dato no mostrado). Tampoco detectamos diferencias al utilizar el marcador específico de microglia Iba1, (dato no mostrado). Por último, descartamos un proceso de muerte programada, realizando la técnica TUNEL y mediante el marcaje con caspasa 3 activada, y no se observó ninguna célula apoptótica en las secciones de nuestros animales (dato no mostrado). Para estudiar con mayor detalle la muerte celular, realizamos cultivos de CMHP obtenidas a partir de animales WT y KO y analizamos por citometría de flujo el marcaje con anexina V e IP, que permite distinguir las células

apoptóticas y muertas de las viables. Así, observamos que los cultivos de CMHP de ratones KO no presentaban diferencias con respecto a los cultivos WT en el porcentaje de células muertas (Fig. 67).

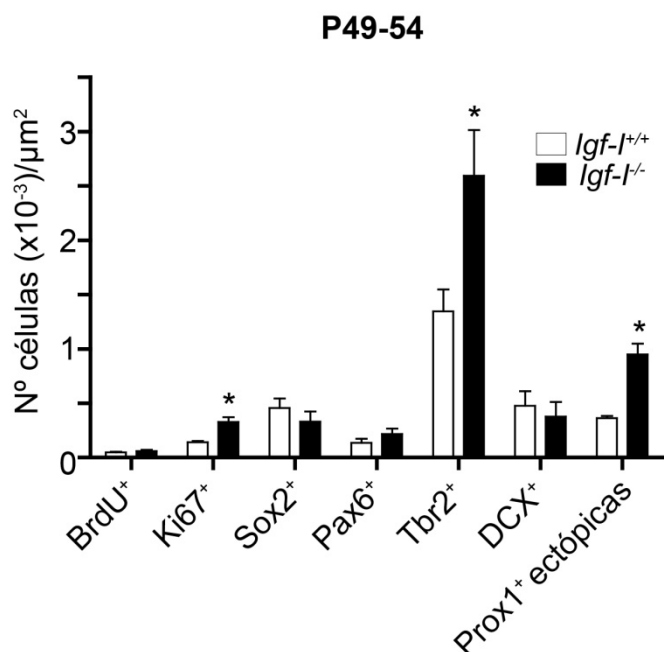


Figura 66: Resumen del impacto de la delección de *Igf-I* sobre distintos estadios de la neurogénesis en el GD.

El gráfico muestra el número de células positivas para cada marcador por área del GD de animales WT y KO. Los resultados son la media \pm SEM de 3-6 animales por genotipo y han sido tomados de las figuras 54, 58, 60, 62, 63 y 64. La falta de IGF-I aumenta el número de células Ki67⁺, progenitores neuronales Tbr2⁺ y de neuronas Prox1⁺ ectópicas. *P< 0,05 (t de Student).

Nuestros resultados demuestran que IGF-I regula la transición de la población de células madre multipotentes a progenitores intermedios neuronales en el GD del HP postnatal-adulto, así como, la correcta diferenciación y el posicionamiento de dichos progenitores y de las células grano.

4.6. Papel de IGF-I en la migración y maduración neuronal *in vivo*

Para analizar con otra aproximación experimental el efecto de IGF-I durante la migración, maduración y posicionamiento de las neuronas grano del GD durante la época postnatal, realizamos inyecciones de partículas retrovirales que expresan la EGFP. Esta técnica permite marcar las células proliferativas en animales WT y KO y analizar 21 después la posición y morfología de las neuronas formadas a partir de las mismas (Zhao et al. 2006).

En animales WT y KO, encontramos que la mayoría de las células GFP⁺ eran Prox1⁺ 21 días postinyección (dpi) (80-95%, Fig. 68 A-B). Sin embargo, no se encontró ninguna célula GFP positiva para GFAP o Iba1 en ninguno de los genotipos (Fig. 68 C-F). Las células GFP⁺ en los animales KO presentaron una morfología más inmadura que las de los animales WT, reflejada en una longitud 1,7 veces menor (P<0,01) sin afectarse el número de ramificaciones dendríticas (Fig. 69 A-D). Además, se observó que las células GFP⁺ en los animales KO se disponían en zonas de la CCG más alejadas de la ZSG (Fig. 69 E).

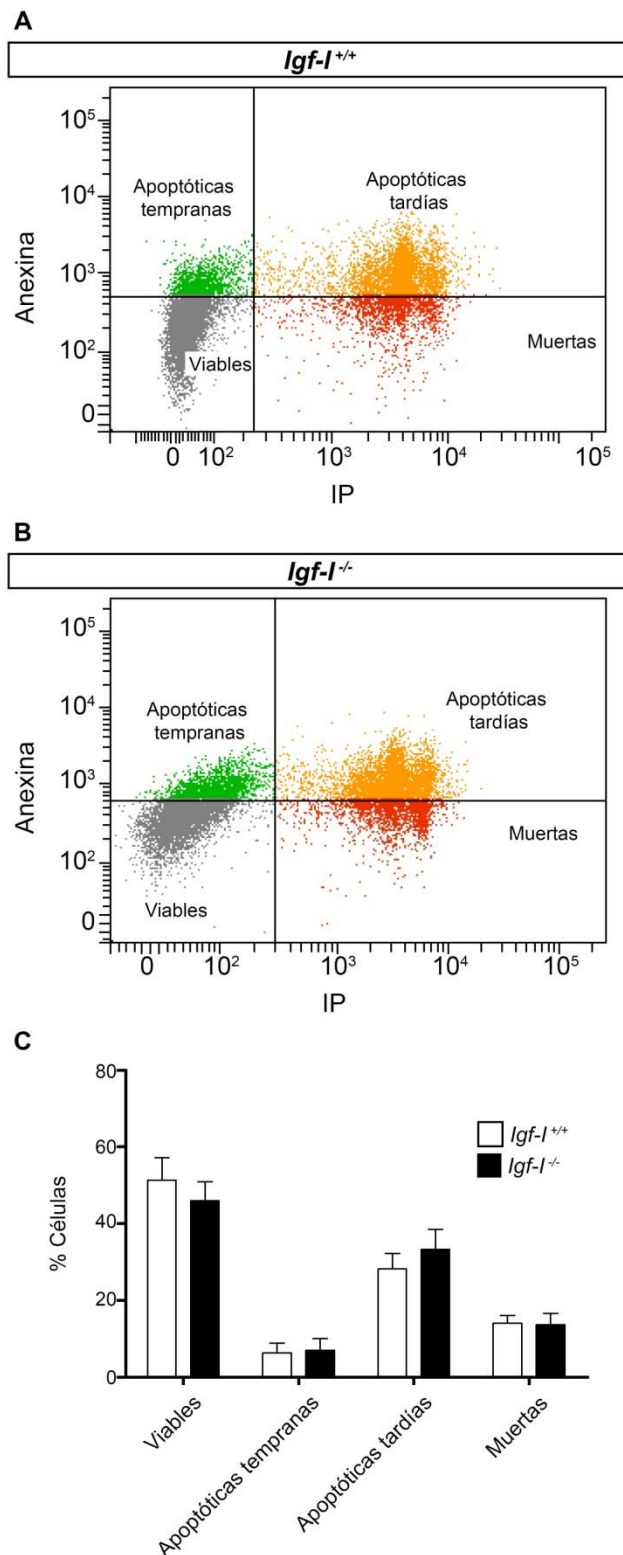


Figura 67: Análisis de la muerte celular en CMHP de animales WT y KO para *Igf-I*. Las CMHP fueron obtenidas a partir de ratones WT y KO de edad P21 y crecidas como neuroesferas. Estas fueron disgregadas y las células teñidas con IP y anexina V para su análisis por citometría de flujo. **(A)** Los gráficos de puntos muestran la distribución de las CMHP WT y KO en células viables (Anexina⁻ IP⁻), apoptóticas tempranas (Anexina⁺ IP⁻), apoptóticas tardías (Anexina⁺ IP⁺) y muertas (Anexina⁻ IP⁺). **(B)** El gráfico indican el porcentaje de células en cada uno de los grupos en cultivos de animales WT y KO. Los resultados son la media \pm SEM de 4 experimentos por genotipo. IP=ioduro de propidio.

Aunque es necesario el análisis de un número mayor de animales, estos primeros resultados apoyan los obtenidos mediante el análisis inmunohistoquímico e indican que IGF-I es esencial para la maduración de las neuronas grano en el GD postnatal-adulto.

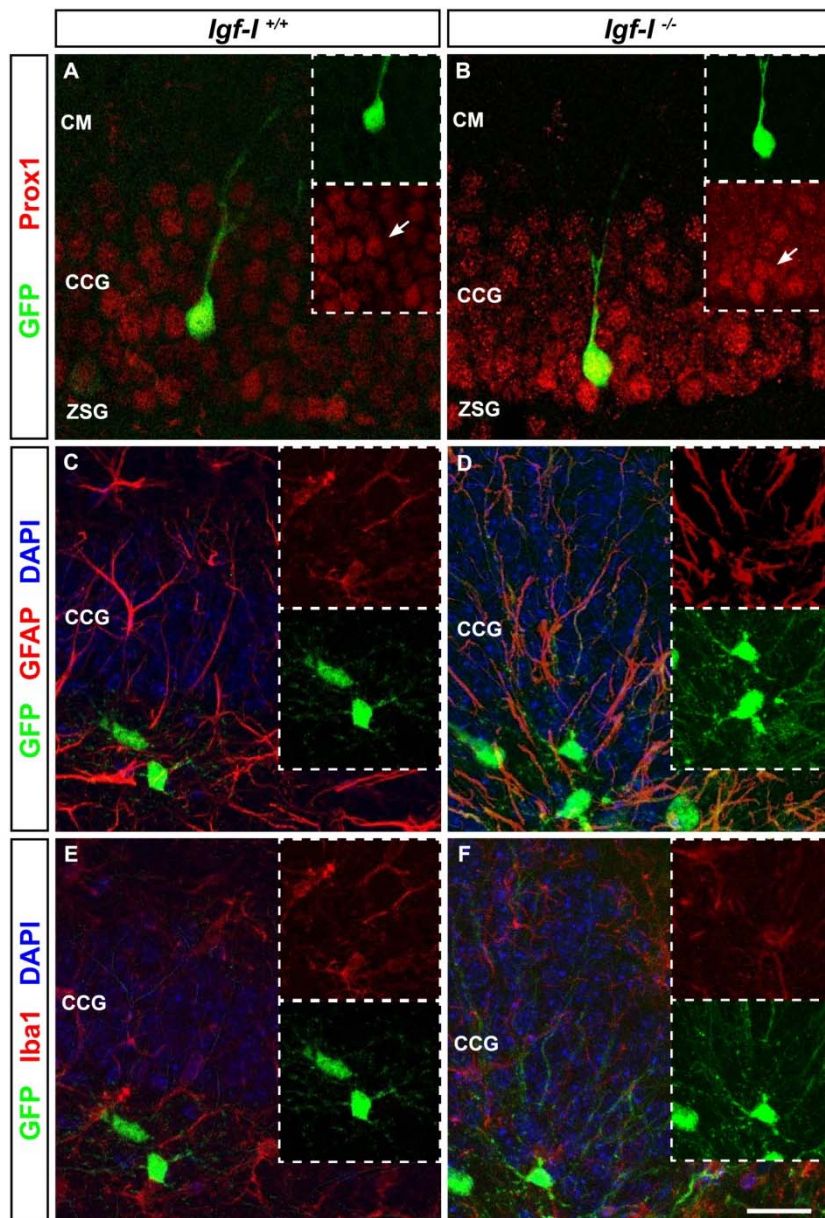


Figura 68: Caracterización de las células de nueva formación en animales WT y KO para *Igf-I*. Vectores retrovirales se inyectaron mediante estereotaxia en animales *Igf-I*^{+/+} y *Igf-I*^{-/-} de edad P21 para marcar los progenitores proliferativos y, a continuación, las células formadas se analizaron 21 días postinyección (dpi). Las secciones coronales de los animales WT y KO fueron inmunoteñidas contra Prox1 y GFP (A-B), contra GFAP y GFP (C-D) y contra Iba1 y GFP (E-F) y teñidas con DAPI. En los insertos se puede observar la inmunotinción de las células GFP⁺ con los distintos marcadores empleados. En estos ensayos sólo se detectaron células GFP⁺/Prox1⁺. Las imágenes son representativas de 2 animales por genotipo. Barra de escala (F) = 21,5 μ m. CCG=capa de células grano; CM=capa molecular; ZSG=zona subgranular.

Análisis de algunos mecanismos moleculares que pudieran estar implicados en el efecto de la falta de IGF-I en el GD

Cuando IGF-I se une al receptor, este se autofosforila y activa la enzima PI3K que participa en la fosforilación de Akt, iniciándose así la cascada de señalización intracelular (Bondy y Cheng 2004; Otaegi et al. 2006; Fernandez y Torres-Aleman 2012). Para investigar si el ratón KO de IGF-I tenía afectada la vía de señalización de la PI3K, realizamos mediciones relativas de la cantidad de Akt y de P-Akt mediante Western Blot en extractos de todo el HP de ratones adultos WT y KO para IGF-I. No encontramos cambios en los niveles totales de Akt ni en su forma activada, P-Akt^{Ser473}, en los animales KO con respecto a los niveles en el WT (Fig. 70), indicando que la falta de IGF-I no parece alterar esa vía de señalización de un modo general en el HP completo.

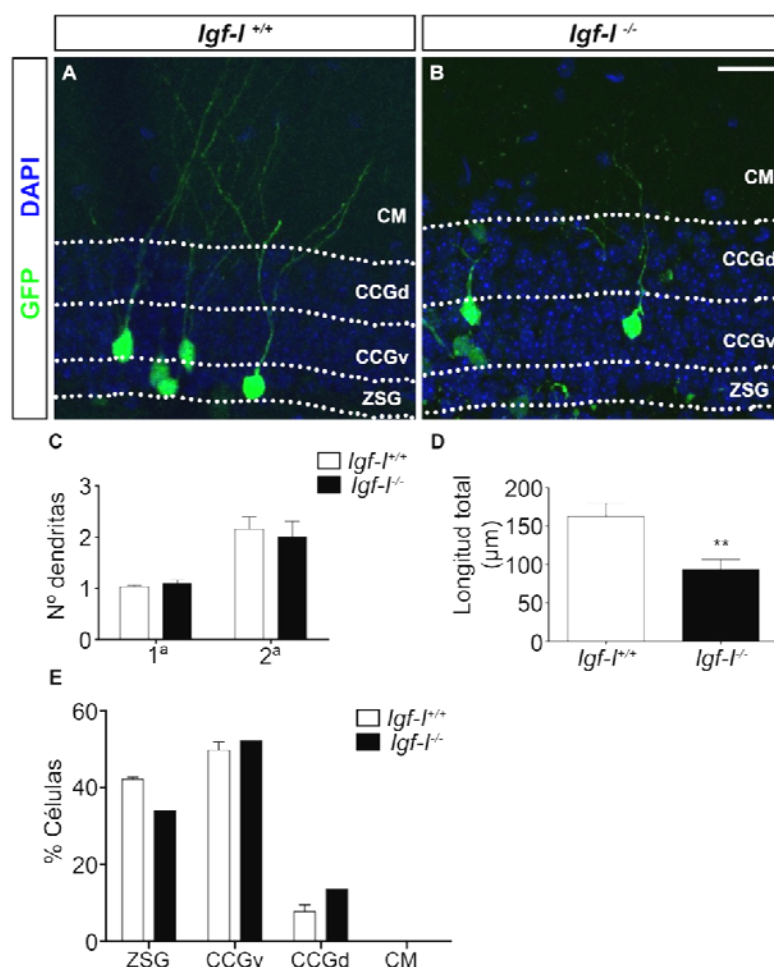


Figura 69: Morfología de las neuronas de nueva formación en animales WT y KO para *Igf-I*. Vectores retrovirales se inyectaron mediante estereotaxia en animales *Igf-I*^{+/+} y *Igf-I*^{-/-} P21 para marcar las células proliferativas y las neuronas formadas se analizaron 21dpi. **(A-B)** Secciones coronales de los animales WT y KO fueron inmunoteñidas contra GFP para visualizar la morfología y el posicionamiento de las neuronas. **(C)** En el gráfico se indica el número de dendritas primarias y secundarias de las neuronas GFP⁺ en animales WT y KO. **(D)** El gráfico muestra la longitud de las neuronas GFP⁺ en animales WT y KO. **(E)** En el gráfico se representa el porcentaje de células GFP⁺ en las distintas capas del GD en animales WT y KO. Imágenes representativas de 2 animales por genotipo. Los resultados son la media \pm SEM de 29-32 neuronas de 2 animales por genotipo. Barra de escala (B) = 21,5 μ m. CCGd=capa de células grano, área dorsal; CCGv=capa de células grano, área ventral; CM=capa molecular; ZSG=zona subgranular.

Entre los sustratos de la enzima Akt se encuentra CREB, el cual una vez activado por fosforilación regula la transcripción de genes involucrados en ciclo celular y supervivencia (ver Figura 9 de la Introducción). Por ello, quisimos analizar si los niveles de P-CREB estaban alterados debido a la falta de IGF-I en el HP de ratones P49. Para ellos, teñimos con un anticuerpo contra P-CREB secciones coronales de animales WT y KO para IGF-I y analizamos la cantidad de marcaje en la CCG del GD (representado como porcentaje de área marcada en la CCG, Fig. 71). Aunque en ambos genotipos encontramos tinción nuclear con P-CREB, los animales KO presentaron un mayor área marcada comparado con los animales WT en todas las camadas analizadas (incremento del 62,07%; $P < 0,05$ t de Student pareado).

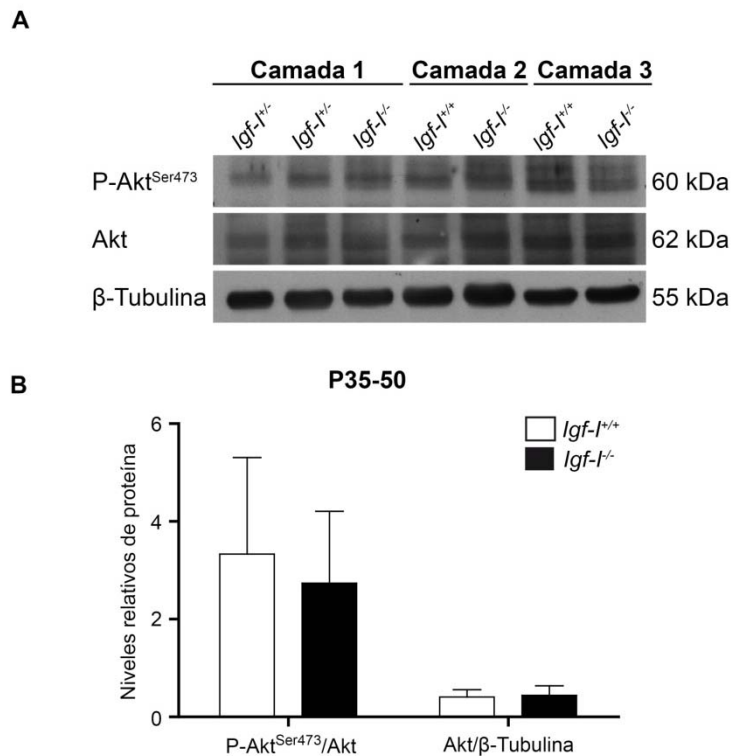


Figura 70: Análisis de la fosforilación de la Akt en el hipocampo de ratones *Igf-1^{-/-}*. Los hipocampos de ratones adultos (P49) WT y KO fueron disecados, las proteínas totales extraídas y se cuantificaron los niveles relativos de Akt y P-Akt para su análisis por Western Blot. **(A)** En la imagen se muestran las bandas obtenidas para Akt, P-Akt^{Ser473} y β-Tubulina (control de carga) en animales *Igf-1^{+/+}*, *Igf-1^{+/-}* y *Igf-1^{-/-}* de tres camadas distintas. Además, se indican los pesos moleculares de las proteínas en estudio. **(B)** En el gráfico se representan los niveles relativos P-Akt^{Ser473}/Akt y Akt/β-Tubulina en animales WT y KO, no observándose cambios significativos entre ellos. Los resultados son la media ± SEM de 3-4 animales por genotipo.

Por otro lado, quisimos analizar si la eliminación de IGF-I podría afectar la ruta de señalización de la relina como se ha descrito en estudios en el BO (Hurtado-Chong et al. 2009). Para lo cual, analizamos los niveles de la forma activada de Dab1 (P-Dab1^{Y232}), una proteína adaptadora de la vía de la relina (Keilani et al. 2012), mediante el mismo método utilizado para P-CREB. Tanto en secciones de animales WT como KO, las células P-Dab1⁺ se localizaban en la ZSG del GD y presentaban una morfología radial (Fig. 72 A-F). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de área marcada entre los dos genotipos (Fig. 72 G).

Nuestros resultados, aunque aún no definitivos, sugieren que el aparente aumento de la fosforilación de CREB en el GD del ratón KO para IGF-I pudiera ser un mecanismo compensatorio por la disminución inicial de la señalización intracelular activada por IGF-I.

4.7. Generación y análisis del ratón Nestina-Cre:*Igf-1*

Con el objetivo de aumentar la escasa supervivencia postnatal de los ratones KO provocada posiblemente por la falta de maduración pulmonar (Pichel et al. 2003; Hurtado-Chong et al. 2009; Fernandez y Torres-Aleman 2012) y, además, analizar específicamente el papel del IGF-I cerebral en la neurogénesis adulta, nos propusimos la generación de un ratón transgénico que careciera de *Igf-1* exclusivamente en el SN. Este transgénico se obtuvo mediante el cruce de la línea *Igf-1* loxP y la línea Nestina-Cre (Zimmerman et al. 1994; Liu et al. 1998; Tronche et al. 1999; Panchision et al. 2001), en colaboración con el Dr. James Pichel, NIH, (EEUU). En la línea Nestina-Cre, la expresión de la Cre está dirigida por el promotor y de un potenciador (*enhancer*) del gen de la *nestina* que dirige la expresión de la proteína en el sistema nervioso (SN) (Zimmerman et al. 1994; Tronche et al. 1999).

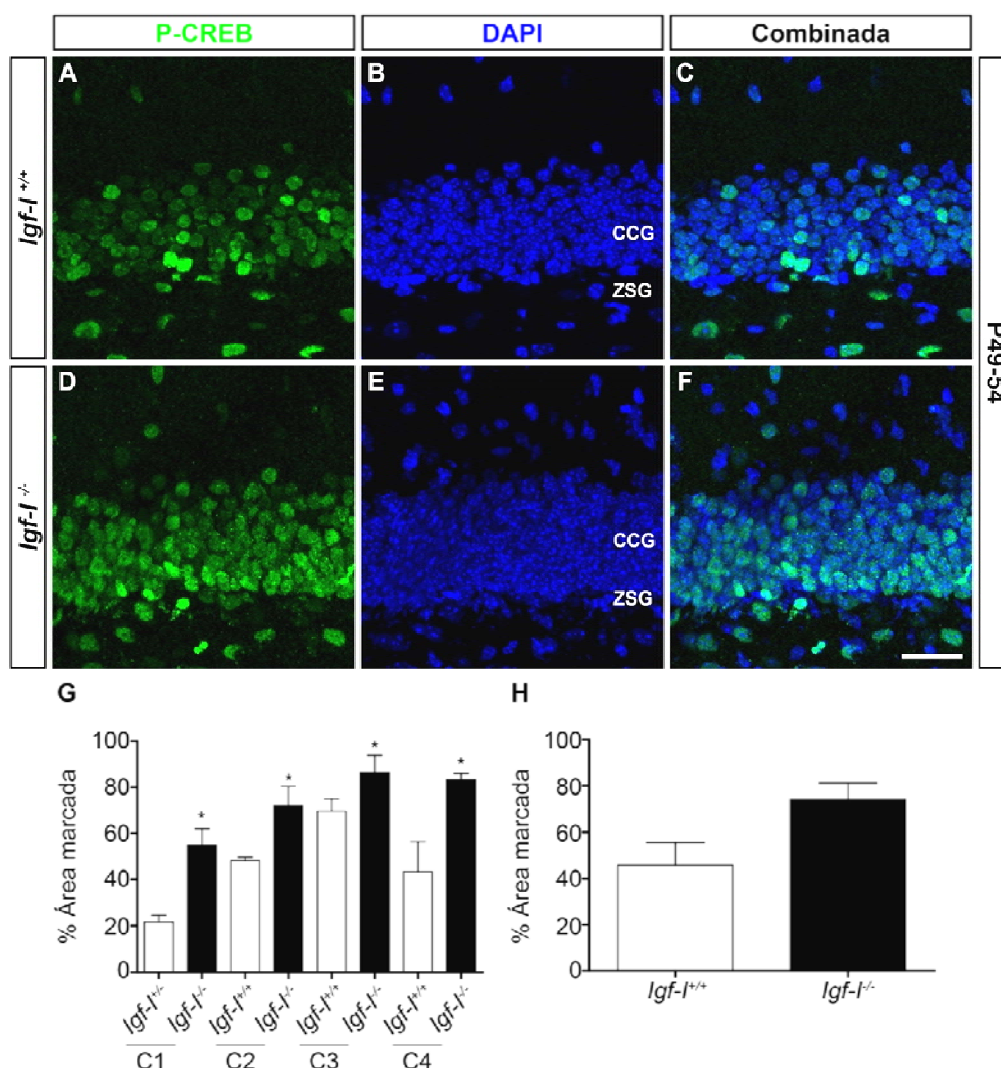


Figura 71: Análisis de la fosforilación de CREB en el GD de ratones *Igf-I*^{-/-}. Secciones coronales de ratones P49-54 WT y KO fueron inmunoteñidas con anti-P-CREB y teñidas con DAPI. (A-F) Imágenes representativas de la CCG donde se observa la expresión de P-CREB. (G) El gráfico muestra el porcentaje de área P-CREB⁺ en la CCG de animales P49-54 WT y KO, en las distintas capas analizadas. Los datos son la media ± SEM de 8 secciones por animal, *P<0,05 (t de *Student* pareado). (H) El gráfico muestra el porcentaje promedio de las 4 capas de área marcada en la CCG de animales P49-54 WT y KO. Los datos son la media ± SEM de 4 animales por genotipo, P= 0,0581 (t de *Student* no pareado). Barra de escala (F) = 28,7 μm. CCG=capa de células grano, ZSG=zona subgranular.

4.7.1. Análisis de las líneas de ratones *Igf-I* loxP y Nestina-Cre

En primer lugar, comprobamos que las líneas de ratones elegidas no presentaban alteraciones en su crecimiento embrionario ni adulto, para lo cual se realizó un estudio macroscópico e histológico de los ratones de cada una de ellas.

Los ratones adultos *Igf-I*^{+/+}, *Igf-I*^{+/fl} e *Igf-I*^{fl/fl} a la edad de P49 presentaron un tamaño corporal y cerebral similar (Fig. 73 A y B), no encontrándose diferencias significativas entre ellos (Fig. 73 C). Seguidamente, teñimos con violeta de cresilo secciones coronales del BO, la ZSV y del HP de embriones E18,5 y de adultos P49 *Igf-I*^{+/+} y *Igf-I*^{fl/fl} (Fig. 74 y Fig. 75), en las cuales no se observaron diferencias estructurales, a nivel macroscópico, en las distintas regiones analizadas. Además, en los

animales P49 se estimó el volumen del GD y del CA de ratones *Igf-1^{+/+}* y *Igf-1^{fl/fl}*, obteniéndose valores similares en ambos genotipos (Fig. 75 Ñ).

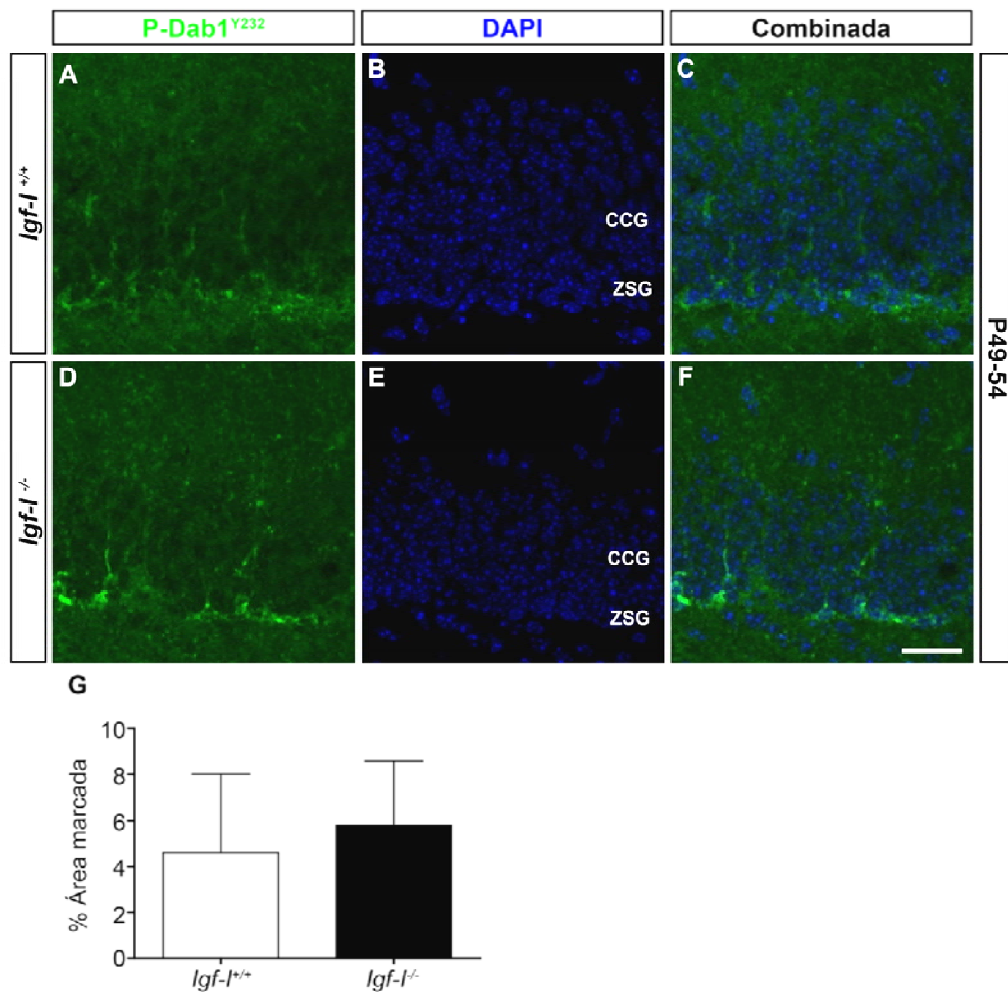


Figura 72: Análisis de la fosforilación de Dab1 en el GD de animales carentes de IGF-I. Secciones coronales de ratones P49-54 WT y KO fueron inmunoteñidas con un anticuerpo contra P-Dab1^{Y232} y teñidas con DAPI. (A-F) En las imágenes se observa la expresión de P-Dab1^{Y232} en la ZSG. (G) El gráfico muestra el porcentaje de área P-Dab1⁺ en la CCG de animales P49-54 WT y KO. Los datos son la media ± SEM de 4 animales por genotipo (P= 0,79, t de Student). Barra de escala (F) = 22 µm. CCG=capa de células grano, ZSG=zona subgranular.

De manera similar se analizaron los animales de la línea Nestina-Cre. Los animales Cre⁺ presentaron tamaños corporales y cerebrales similares a los ratones Cre⁻ a la edad P49, aunque se observó una reducción del 13,2% (P=0,20, no significativa) en el peso corporal de los animales Cre⁺. (Fig. 76). Al analizar secciones coronales del BO, la ZSV y el HP de ratones Cre⁺ y Cre⁻ P49 teñidas con violeta de cresilo, no se detectaron diferencias a nivel estructural en ninguna de las regiones (Fig. 77), ni tampoco diferencias significativas en el volumen estimado del HP comparado con los animales control Cre⁻ (Fig. 77 Ñ).

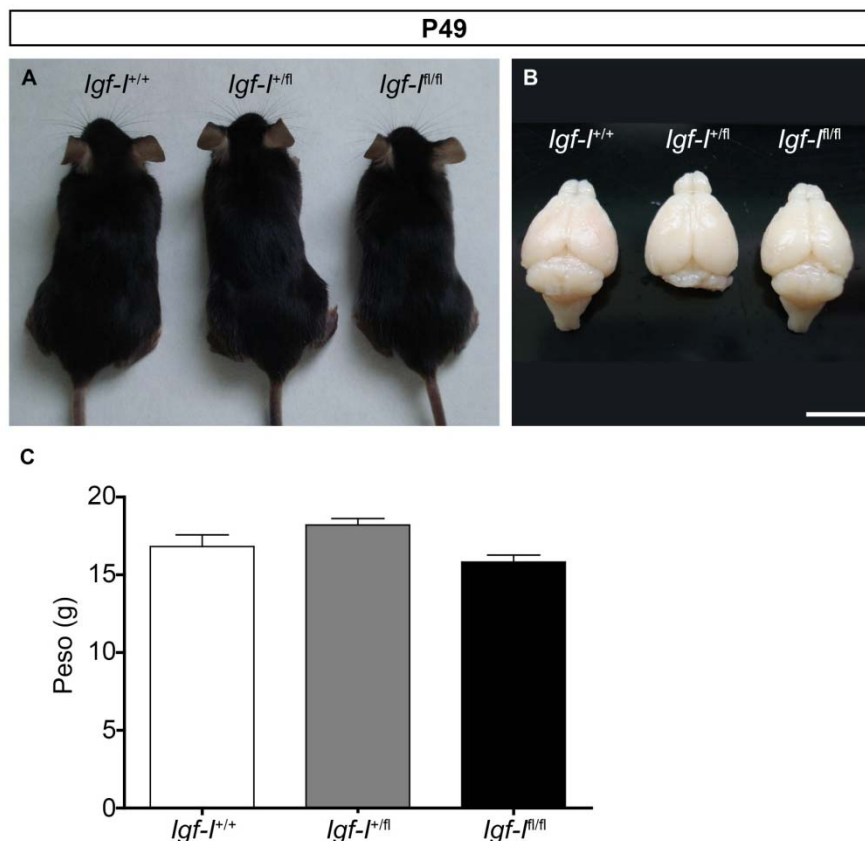


Figura 73: Fenotipo macroscópico de ratones *Igf-I loxP* de edad P49. (A) Fotografía de ratones *Igf-I^{+/+}*, *Igf-I^{+/fl}* e *Igf-I^{fl/fl}* P49. **(B)** En la imagen se observan los encéfalos y el extremo cervical de la médula espinal de los ratones. El cerebelo del *Igf-I^{+/fl}* tuvo un aspecto similar a sus hermanos (no mostrado). **(C)** En el gráfico se representa el peso medio de ratones *Igf-I^{+/+}*, *Igf-I^{+/fl}* e *Igf-I^{fl/fl}* P49. Los resultados son la media \pm SEM de 2 ratones por genotipo. Barra de escala (B) = A, 18 mm; B, 7,4 mm.

A continuación, comprobamos la expresión de la enzima Cre en el SN y otros tejidos, en la línea de ratones Nestina-Cre mediante el cruce de dichos ratones con la línea reportera ROSA26-YFP (Srinivas et al. 2001). Al analizar embriones E12,5 Cre^+ encontramos que la expresión de la enzima Cre, puesta de manifiesto en la expresión directa de la YFP, era muy específica del SN, detectándose una expresión muy baja o ausente en tejidos de origen no neural (Fig. 78A). Al analizar en detalle la expresión de YFP, detectamos niveles muy altos en la corteza y el BO de los ratones Cre^+ (Fig. 78 H-I). Sin embargo, se observó expresión, aunque muy baja, de YFP en el corazón y en el hígado, probablemente debida a los nerviosos presentes en dichos órganos (Fig. 78 J-K), y en el intestino se pudo observar la señal de la YFP en los plexos nerviosos (Fig. 78 L). Por el contrario, en animales Cre^- no se encontró ninguna señal de la YFP (Fig. 78 A, E-G y M-Q). Adicionalmente, las secciones de embriones Cre^+ y Cre^- fueron inmunoteñidas con un anticuerpo contra nestina, para verificar la colocalización con la YFP. De esta manera, comprobamos que la expresión de la YFP se corresponde con las zonas nestina⁺ del SN, aunque también se detectaron células nestina⁺ en otros tejidos como el hígado, el corazón y el intestino que no colocalizaban con la YFP (Fig. 78 B-Q). Resultados de algún modo similares se obtuvieron en ratones adultos P49 (Fig.79). Las secciones del GD de animales Cre^+ poseían una expresión alta de la YFP, siendo especialmente llamativa en células de la ZSG que colocalizaban con Nestina, mientras que en los animales Cre^- no se detectó señal (Fig.79 A y B). Sin

embargo, cuando analizamos secciones del hígado (Fig.79 C y D), el corazón (Fig.79 E y F), el pulmón (Fig.79 G y H) y el intestino (Fig.79 I y J) de animales Cre^+ se encontró un nivel muy bajo o casi indetectable de YFP, similar al presente en los animales Cre^- . Además, para descartar que no se estuviese detectando la expresión de la YFP como consecuencia de la fijación y procesado y distinguirla de la autofluorescencia del tejido, se realizaron inmunotinciones con anticuerpos anti-GFP que también reconocen la proteína YFP, obteniéndose resultados similares a los descritos en ratones Cre^+ y Cre^- P49(dato no mostrado).

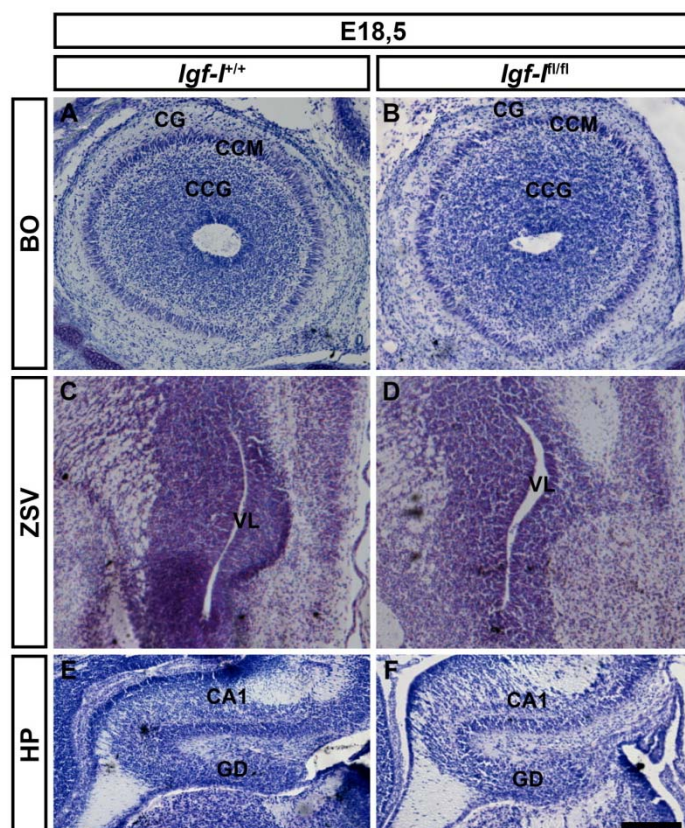


Figura 74: Caracterización histológica de la línea *Igf-I loxP* en ratones de edad E18,5. Secciones coronales de embriones E18,5 *Igf-I^{+/+}* e *Igf-I^{fl/fl}* fueron teñidas con violeta de cresilo. Las imágenes muestran secciones de BO (A-B), ZSV (C-D) e HP (E-F) de *Igf-I^{+/+}* e *Igf-I^{fl/fl}* en las que no se observaron cambios apreciables en la estructura de estas regiones debido a la inserción de las secuencias loxP. Imágenes representativas de 2 animales por genotipo. Barra de escala (F) = 338 μ m. CA=Asta de Ammón, CCG=capa de células grano, CCM= capa de células mitrales, CG=capa glomerular, GD=giro dentado, VL=ventrículo lateral.

4.7.2. Fenotipo macroscópico e histológico del ratón *Igf-I^{Δ/Δ}*

Una vez comprobada la expresión de la enzima Cre bajo el promotor y el *enhancer* de Nestina, cruzamos ratones de la línea Nestina-Cre con ratones de la línea *Igf-I loxP* de los cuales podríamos obtener ratones *Igf-I^{Δ/Δ}* a partir en la segunda generación (ver Material y Métodos, Fig. 13).

Los ratones *Igf-I^{Δ/Δ}* fueron capaces de sobrevivir hasta la edad adulta y pudieron ser cruzados entre sí. A P49, los ratones *Igf-I^{Δ/Δ}* presentaron un tamaño corporal y cerebral ligeramente menor que los ratones control (Fig. 80 A y B). Esta reducción de tamaño, se vio reflejada en una disminución del 12 % (no significativa, $P=0,15$) del peso corporal de los ratones *Igf-I^{Δ/Δ}* comparado con sus hermanos control (Fig. 80 C).

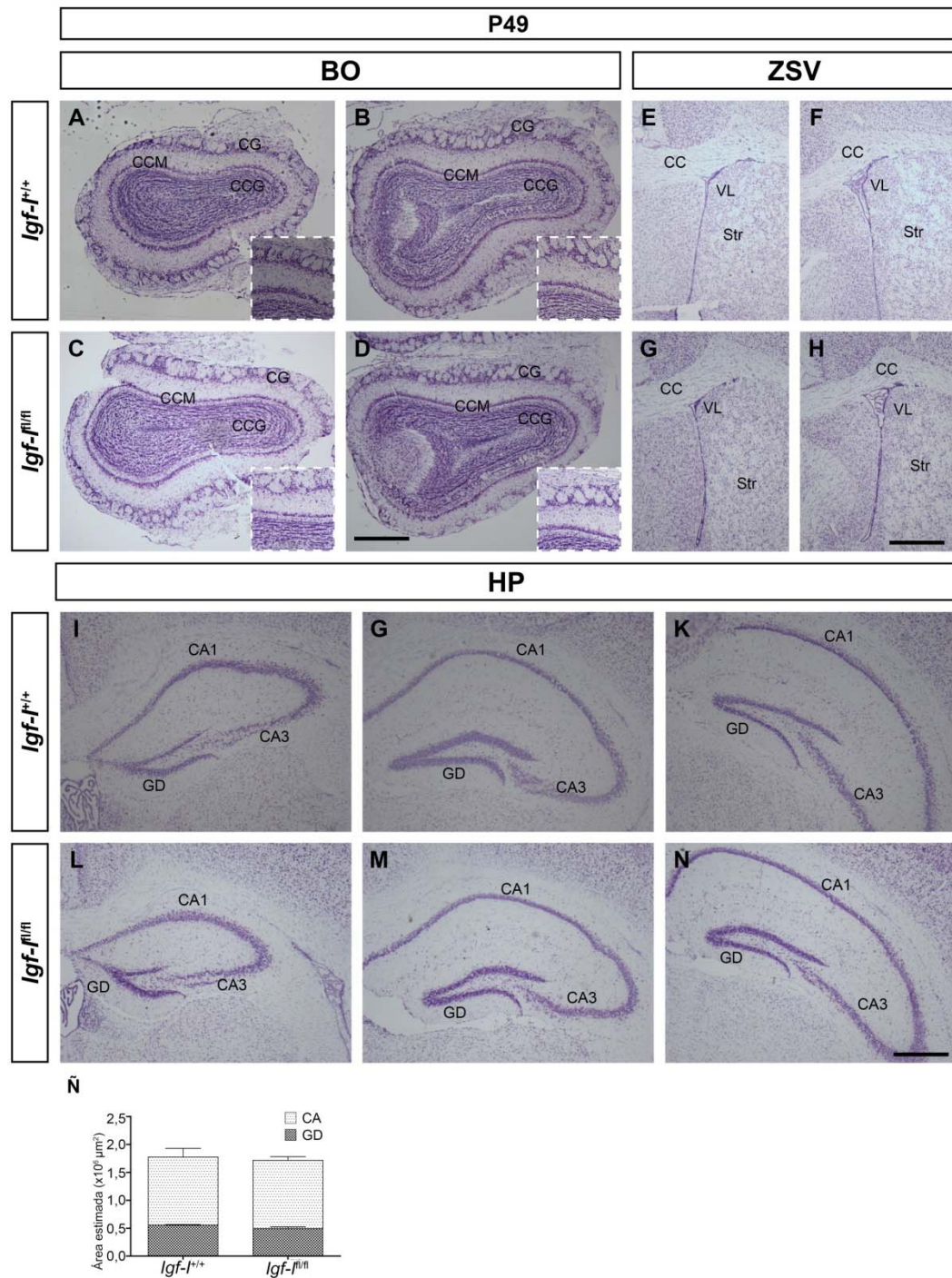


Figura 75: Caracterización histológica de ratones *Igf-1 loxP* a la edad P49. Secciones coronales de ratones P49 *Igf-1^{+/+}* e *Igf-1^{fl/fl}* fueron teñidas con violeta de cresilo. Las secciones del BO (A y C, zona media; B y D, zona relativamente caudal), la ZSV (E y G, zona rostral; F y H, zona media) y el HP (I y L zona septal; G y M, zona media; K y N, zona temporal) de ratones P49 *Igf-1^{fl/fl}* no revelaron diferencias aparentes en la estructura de estas regiones comparado con las del *Igf-1^{+/+}*. Imágenes representativas de 2 animales por genotipo. (Ñ) El gráfico muestra el área estimada del GD y del CA de animales *Igf-1^{+/+}* e *Igf-1^{fl/fl}*. Los resultados son la media \pm SEM de 2 ratones por genotipo. Barra de escala (D, H y N) = A-H, 515 μ m; I-N, 415,37 μ m. CA=Asta de Ammón, CC=cuerpo calloso, CCG=capa de células grano, CCM= capa de células mitrales, CG=capa glomerular, GD=giro dentado, Str=estriado, VL=ventrículo lateral.

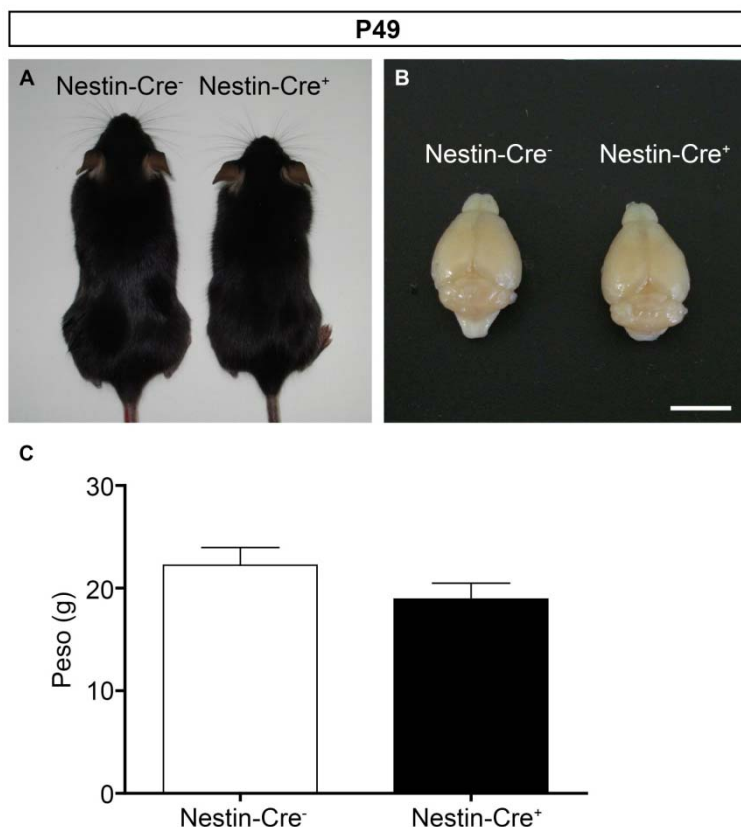


Figura 76: Fenotipo macroscópico del ratón Nestina-Cre a la edad P49. (A) Fotografía de ratones Cre^{-} y Cre^{+} P49. (B) En la imagen se muestran los encéfalos y extremo cervical de la médula espinal de ratones Cre^{-} y Cre^{+} P49. (C) En el gráfico se indica el peso medio de ratones de ambos genotipos. Los resultados son la media \pm SEM de 4 ratones por genotipo. Barra de escala (B) = A, 20 mm; B, 6 mm.

A continuación, analizamos los niveles de expresión de *Igf-I* en el cerebro, el hígado (principal fuente del IGF-I sistémico en el adulto (Fernandez y Torres-Aleman 2012)), el pulmón y el corazón de ratones *Igf-I^{fl/fl}* e *Igf-I^{Δ/Δ}* mediante RT-qPCR. En el cerebro de animales *Igf-I^{Δ/Δ}* se obtuvo una reducción de 6 veces en los niveles relativos de *Igf-I* comparado con los niveles del *Igf-I^{fl/fl}* (Fig. 81 A). El resto de tejidos de animales *Igf-I^{Δ/Δ}* analizados, también mostraron una reducción de los niveles de *Igf-I* (de 1,5-3 veces) con respecto a los animales control (Fig. 81 A). Para descartar que esta bajada en los niveles de *Igf-I* en los tejidos no neurales fuese debida a los nervios presentes en esas estructuras, realizamos cultivos de CMHP (células de origen nervioso) y de células de hígado y fibroblastos (células no nerviosas) y se analizaron los niveles de *Igf-I*. En las CMHP de ratones *Igf-I^{Δ/Δ}* no se detectó expresión de *Igf-I* (n=2), mientras que en las células de hígado y en los fibroblastos se obtuvo una disminución de 2-3 veces en los niveles de *Igf-I* comparados con los obtenidos en los cultivos control (n=1-2, Fig. 81 B). Además, en las células cultivadas extrajimos el ADN para verificar la delección en el gen de *Igf-I* mediante PCR. De esta manera, pudimos detectar la presencia de una banda de menor tamaño (debida a la delección de parte del gen de *Igf-I*) en todas la células de los tejidos analizados del ratón *Igf-I^{Δ/Δ}*, mientras que en las células del ratón control la banda correspondía a la amplificación del fragmento del gen de *Igf-I* sin cortar (n=2, Fig. 81 C; ver Fig.12 de Material y Métodos).

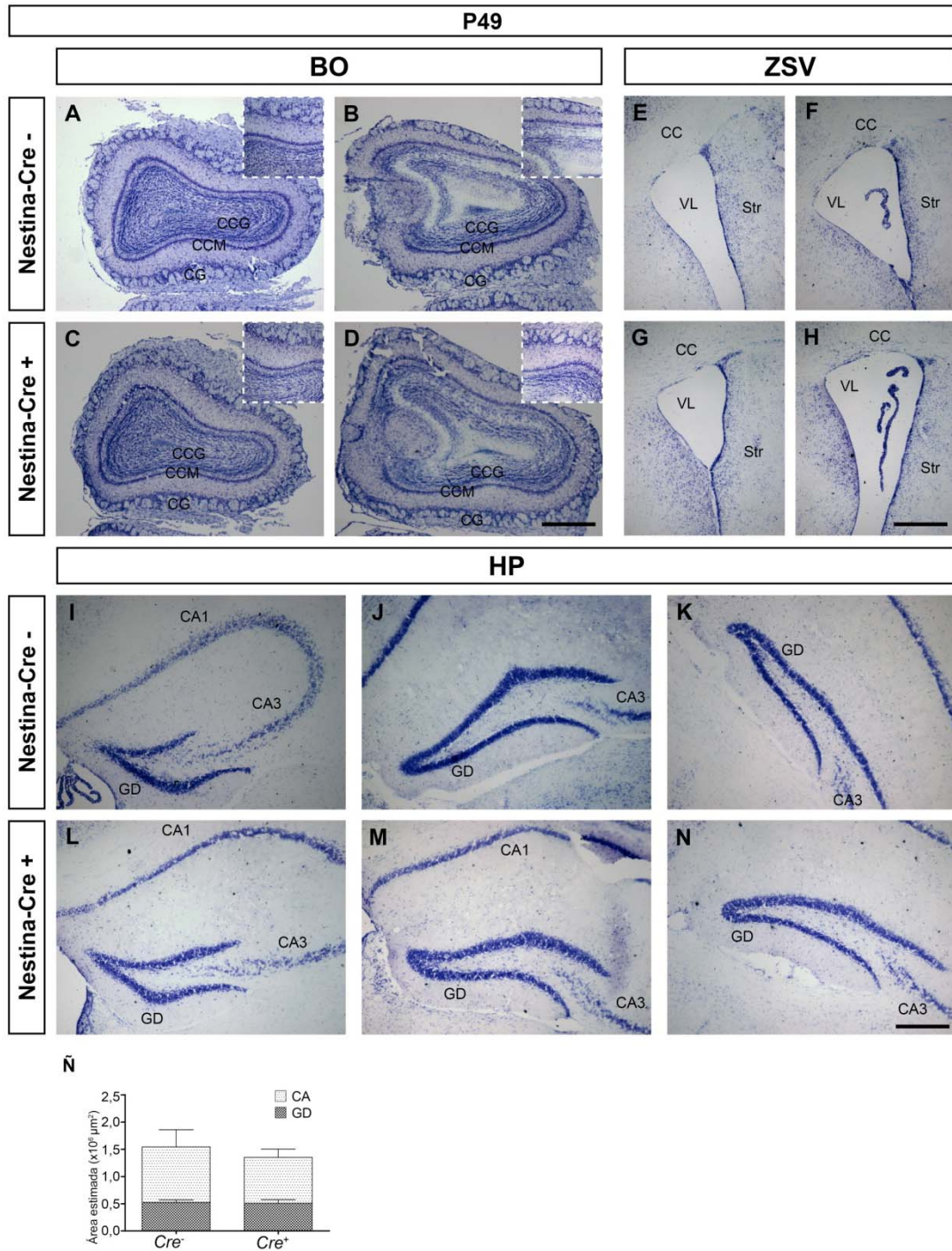


Figura 77: Caracterización histológica de los ratones Nestina-Cre de edad P49. Secciones coroneales de ratones Cre⁻ y Cre⁺ P49 fueron teñidas con violeta de cresilo. En las secciones del BO (A y C zona media; B y D zona relativamente caudal), la ZSV (E y G zona rostral; F y H zona media) y del HP (I y L zona septal; J y M zona media; K y N zona temporal) de ratones P49 Cre⁺ no se apreciaron diferencias comparadas con las secciones del Cre⁻. Imágenes representativas de 2 animales por genotipo. (Ñ) En el gráfico se representa el área estimada del GD y del CA de animales Cre⁻ y Cre⁺. Los resultados son la media \pm SEM de 2 ratones por genotipo. Barra de escala (D, H y N) = A-D, 555,5 μ m; E-H, 678 μ m; I-N, 500 μ m. CA=Asta de Ammón, CC=cuerpo calloso, CCG=capa de células grano, CCM= capa de células mitrales, CG=capa glomerular, GD=giro dentado, Str=estriado, VL=ventrículo lateral.

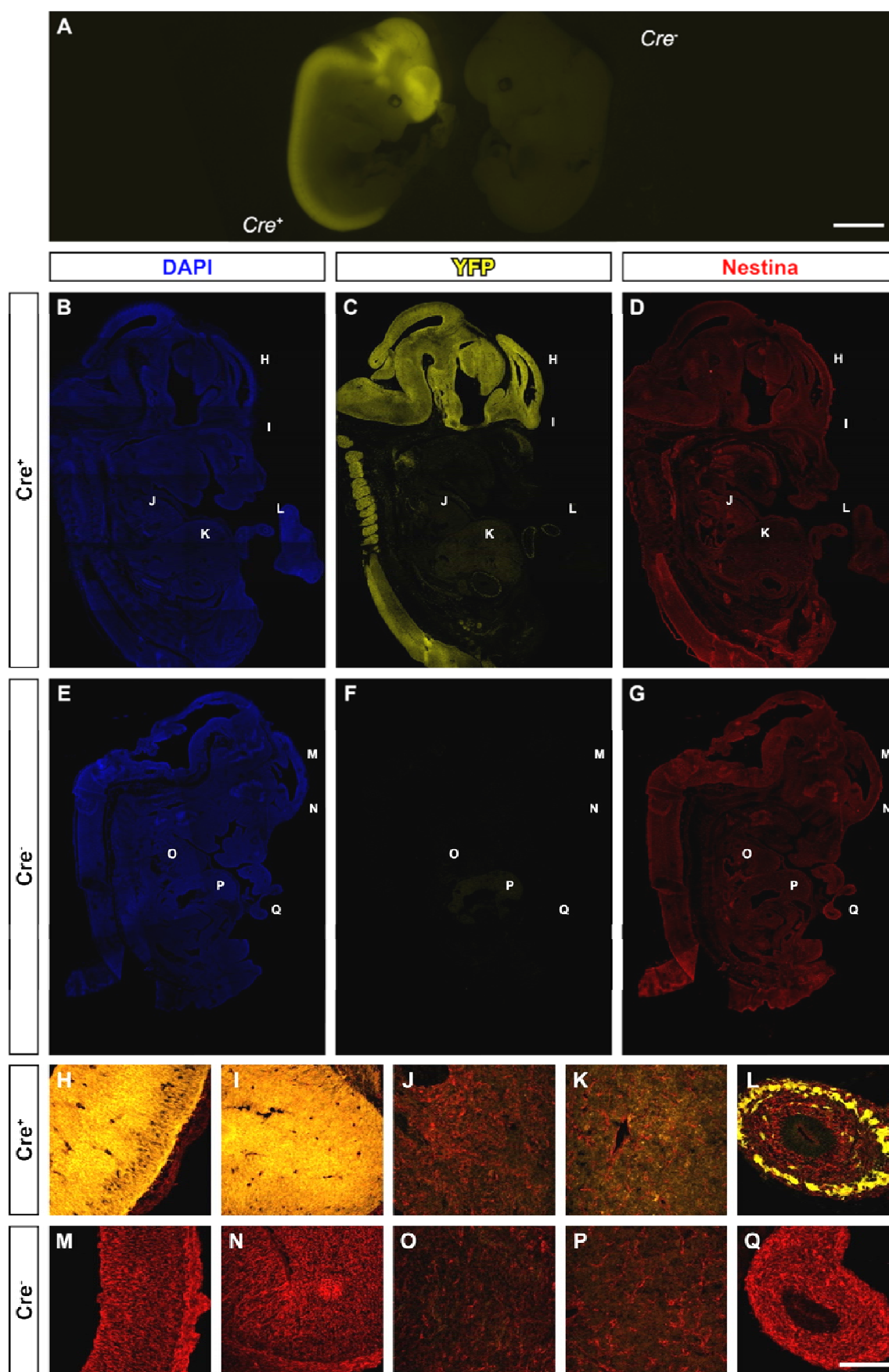


Figura 78: Caracterización de la expresión de la enzima Cre en la línea de ratones Nestina-Cre en embriones E12,5. Ratones Cre^+ se cruzaron con ratones ROSA26-YFP y se analizó la progenie a E12,5 para verificar la actividad de la enzima Cre mediante la expresión de la YFP. **(A)** La imagen muestra embriones E12,5 Cre^+ y Cre^- . Se observa que en el embrión Cre^+ la YFP se expresa en todo el SN. **(B-Q)** Secciones sagitales de embriones E12,5 Cre^+ y Cre^- inmunoteñidas contra Nestina y teñidas con DAPI. H y M muestran imágenes a mayor aumento de la corteza de ratones Cre^+ y Cre^- . En I y N se observa a mayor aumento el BO de ratones Cre^+ y Cre^- . En J y O se presenta un detalle del corazón de ratones Cre^+ y Cre^- . K y P muestran imágenes a mayor aumento el hígado de ratones Cre^+ y Cre^- , respectivamente. L y Q muestran imágenes a mayor aumento del intestino de ratones Cre^+ y Cre^- . Imágenes representativas de 3 animales por genotipo. Barra de escala (Q) = A, 500 μm ; B-G, 1 mm; I-Q = 116,28 μm .

Posteriormente, analizamos secciones histológicas coronales del HP, a varios niveles del eje rostro-caudal, de ratones $Igf-I^{\Delta/\Delta}$ y control teñidas con violeta de cresilo (Fig. 82). Debido al retraso en la obtención de esta línea de ratones (ver Material y Métodos) sólo se han podido analizar dos camadas. Por ello, para los sucesivos análisis se muestran los resultados de cada camada y el valor medio de ambas. Además, dado el reducido número de datos ($n=2$), aunque se ha realizado el correspondiente análisis estadístico, no se ha considerado apropiado incluir la estadística en la gráfica aunque en algunos casos el valor de P fue $<0,05$.

El HP de los animales $Igf-I^{\Delta/\Delta}$ no experimentó alteraciones estructurales macroscópicas como consecuencia de la falta de IGF-I, estando presentes todas las capas que lo componen (Fig. 82 A). Sin embargo, los animales $Igf-I^{\Delta/\Delta}$ presentaron una reducción del 33 % tanto en el volumen como en el área estimados del GD y del 13% en el CA comparado con sus hermanos control, aunque el efecto fue variable entre las dos camadas estudiadas (Fig. 82 B-E). Asimismo, en los animales $Igf-I^{\Delta/\Delta}$, de las dos camadas analizadas, se observó una disminución en el área de la CCG del GD (del 35,9%; $P=0,05$, t de Student; $n=2$) (Fig. 82 F y G).

4.7.3. Análisis de la proliferación y del linaje neuronal en el GD de ratones $Igf-I^{\Delta/\Delta}$

A continuación, analizamos la neurogénesis del GD del HP en los ratones Nestina-Cre: $Igf-I$, en alguno de los estadios celulares en los que se observó un fenotipo mayor en el ratón KO global para $Igf-I$.

En primer lugar estudiamos la proliferación celular para lo cual teñimos secciones coronales del HP de ratones $Igf-I^{\Delta/\Delta}$ y de sus hermanos control con anticuerpos contra Ki67 (Fig. 83). Los animales $Igf-I^{\Delta/\Delta}$ poseían un mayor número de células Ki67⁺ (incremento del 64,2%) en el GD del HP, aunque en una de las camadas estudiadas el efecto fue menor (Fig. 83 G-H). Además, se observó que las células Ki67⁺ en los animales $Igf-I^{\Delta/\Delta}$ ocupaban capas más externas de la CCG e incluso de la CM comparado con los animales control (Fig. 83 I).

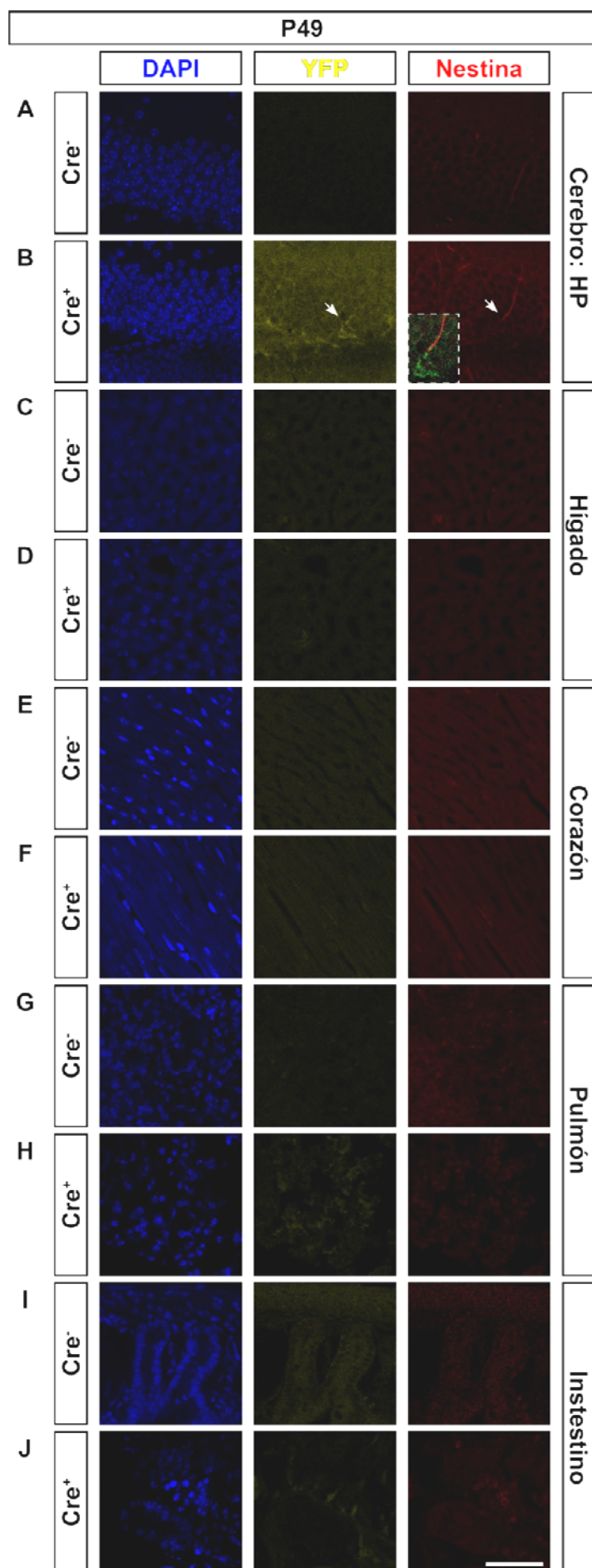


Figura 79: Caracterización de la expresión de la enzima Cre en la línea de ratones Nestina-Cre de edad P49. Los ratones Cre⁺ se cruzaron con ratones ROSA26-YFP y se analizó la progenie a P49 para verificar la actividad de la enzima Cre asociada a la expresión de la YFP. (A y B) Las imágenes de microscopía confocal muestran en detalle la CCG del GD de animales Cre⁻ y Cre⁺. Se observa que las secciones del ratón Cre⁺ poseen una expresión mayor de la YFP, siendo más alta en células de la ZSG. En el inserto se visualiza la colocalización de la YFP con nestina. En el resto de tejido analizados, hígado (C y D), corazón (E y F), pulmón (G y H) e intestino (I y J), sólo se detectó la autofluorescencia de las células tanto en los animales Cre⁻ como en los Cre⁺. Imágenes representativas de 2 animales por genotipo. Barra de escala (J) = 57,2 µm.

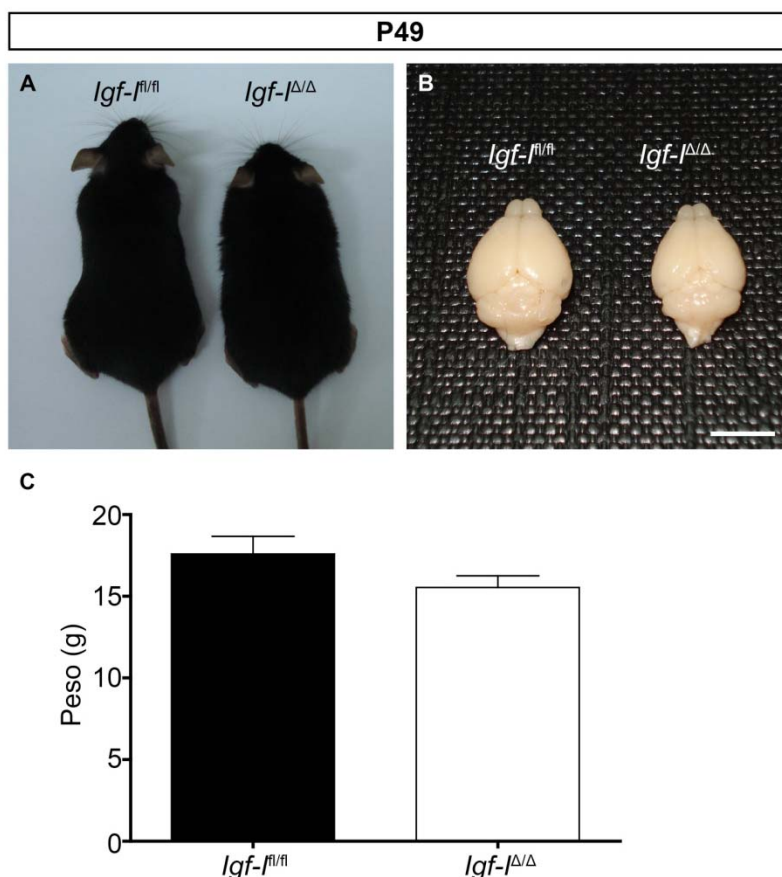


Figura 80: Fenotipo macroscópico de los ratones Nestina-Cre:*Igf-1* a la edad de P49. (A) Fotografía de ratones *Igf-1^{fl/fl}* e *Igf-1^{Δ/Δ}* P49. **(B)** En la imagen se muestran los encéfalos y extremo cervical de la médula espinal de ratones *Igf-1^{fl/fl}* e *Igf-1^{Δ/Δ}*. **(C)** En el gráfico se indica el peso medio de ratones de ambos genotipos. Los animales *Igf-1^{Δ/Δ}* presentaron una reducción del 12% (no significativa) del peso corporal comparado con los ratones *Igf-1^{fl/fl}*. Los resultados son la media \pm SEM de 5 ratones por genotipo. Barra de escala (B) = A, 20 mm; B, 7,1 mm.

A continuación, analizamos el marcador de progenitores neuronales intermedios Tbr2⁺. Los dos animales *Igf-1^{Δ/Δ}* analizados presentaron un acúmulo de células Tbr2⁺ (incremento del 52,4%; $P=0,06$, t de Student; $n=2$) en la CCG del GD con respecto a los animales control (Fig. 84 A-H). Además, aunque en los animales de ambos genotipos, las células Tbr2⁺ se situaban principalmente en la ZSG o en zonas próximas a ella (CCGv), en los animales *Igf-1^{Δ/Δ}* algunas se localizaron en capas más externas e incluso en la CM (Fig. 84 A-F e I).

Seguidamente, se estudió el marcador de neuronas inmaduras DCX. En los dos animales *Igf-1^{Δ/Δ}* examinados se encontró un ligerísimo aumento del número de células DCX⁺ en el GD comparado con los animales control (Fig. 85 A-H). Sin embargo, las neuronas DCX⁺ en el GD de los ratones *Igf-1^{Δ/Δ}* presentaron una reducción del 41 % en la longitud de su dendrita mayor comparado con los animales control (Fig. 85 A-F, I y J). Es más, las dendritas de las células DCX⁺ en los animales control crecían hasta el límite superior de la CM, mientras que en los animales *Igf-1^{Δ/Δ}* las dendritas no sobrepasaban la mitad de la CM, como refleja el menor porcentaje que ocupa la longitud de las dendritas DCX⁺ con respecto a la longitud desde la SZG hasta la fisura hipocampal (Fig. 85 A-F, K y L).

A pesar de que estos resultados deben ser corroborados y ampliados con un número mayor de animales, los ratones Nestina-Cre:*Igf-1* poseen una acumulación de progenitores neuronales en la CCG y una menor complejidad de las neuronas inmaduras del GD, fenotipo similar al encontrado en el ratón KO global para *Igf-1*.

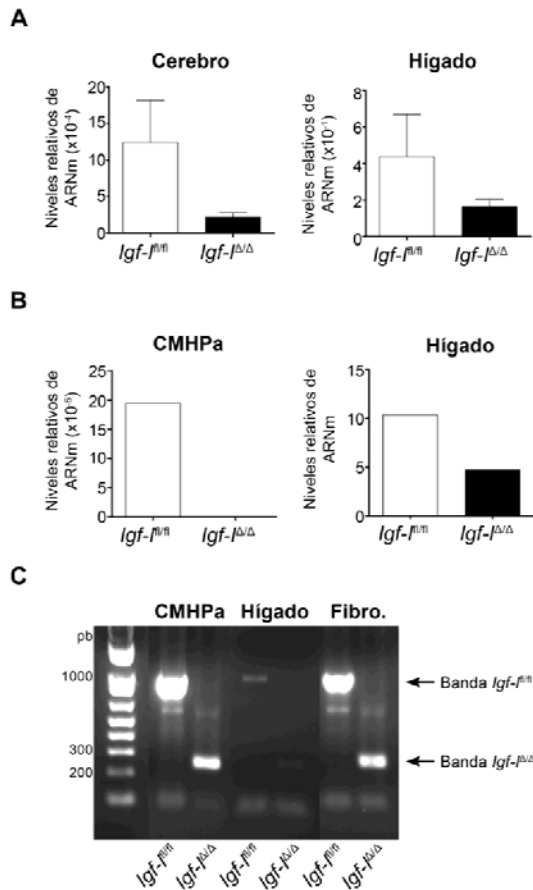


Figura 81: Expresión de *Igf-I* en tejidos y cultivos celulares obtenidos a partir de ratones Nestina-Cre:*Igf-I*. (A) Los gráficos indican los niveles relativos del ARNm de *Igf-I* en tejido del cerebro, hígado, pulmón y corazón de ratones *Igf-I^{fl/fl}* e *Igf-I^{Δ/Δ}*. Los resultados son la media \pm SEM de 4 ratones por genotipo. (B) Los gráficos muestran los niveles relativos de *Igf-I* en CMHP, células de hígado y fibroblastos obtenidos a partir de ratones *Igf-I^{fl/fl}* e *Igf-I^{Δ/Δ}*. Los resultados son la media \pm SEM de 1-2 cultivos y ratones por genotipo. (C) La imagen muestra las bandas de los fragmentos de PCR resultantes del ADN extraído a partir de CMHP, células de hígado y fibroblastos

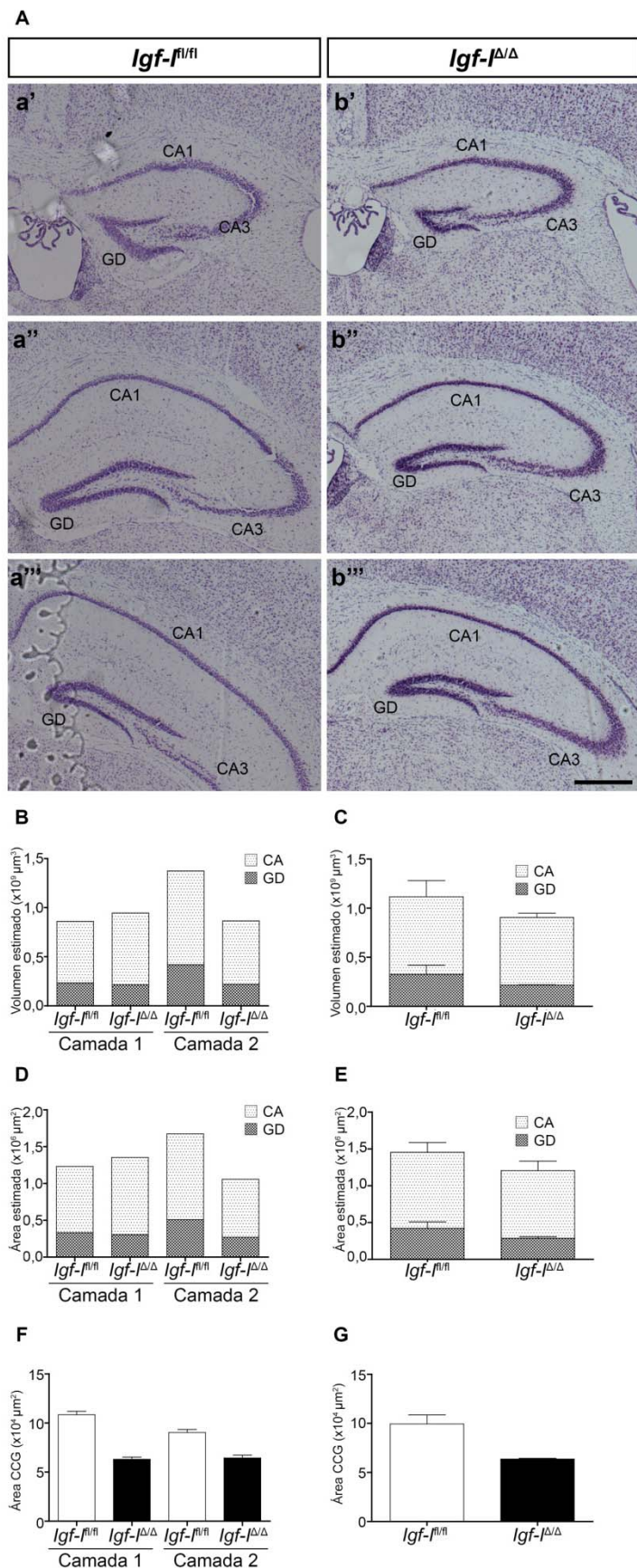


Figura 82: Caracterización histológica del HP de los ratones Nestina-Cre:*Igf-1* a la edad de P49. (A) Se muestran imágenes de secciones coronales del HP de ratones *Igf-1^{fl/fl}* e *Igf-1^{Δ/Δ}* P49 teñidas con violeta de cresilo (a' y b' zona septal; a'' y b'' zona media; a''' y b''' zona temporal). Imágenes representativas de 2 animales por genotipo. (B y C) En los gráficos se muestran el volumen estimado del GD y el CA de ratones *Igf-1^{fl/fl}* e *Igf-1^{Δ/Δ}* por camada y el promedio de las dos camadas. (D y E) En los gráficos se ilustra el área estimada del GD y el CA de ratones *Igf-1^{fl/fl}* e *Igf-1^{Δ/Δ}* por camada y el promedio de las dos camadas. (F y G) En los gráficos se representa el área de la CCG de ratones *Igf-1^{fl/fl}* e *Igf-1^{Δ/Δ}* por camada y el promedio de las dos camadas. El volumen y el área estimada del GD y del CA de los animales *Igf-1^{Δ/Δ}* disminuyó un 33% y un 13%, respectivamente, comparado con sus hermanos control. Los resultados son la media \pm SEM de 2 ratones por genotipo. Barra de escala (A) = 500 μ m. CA=Asta de Ammón, GD=giro dentado.

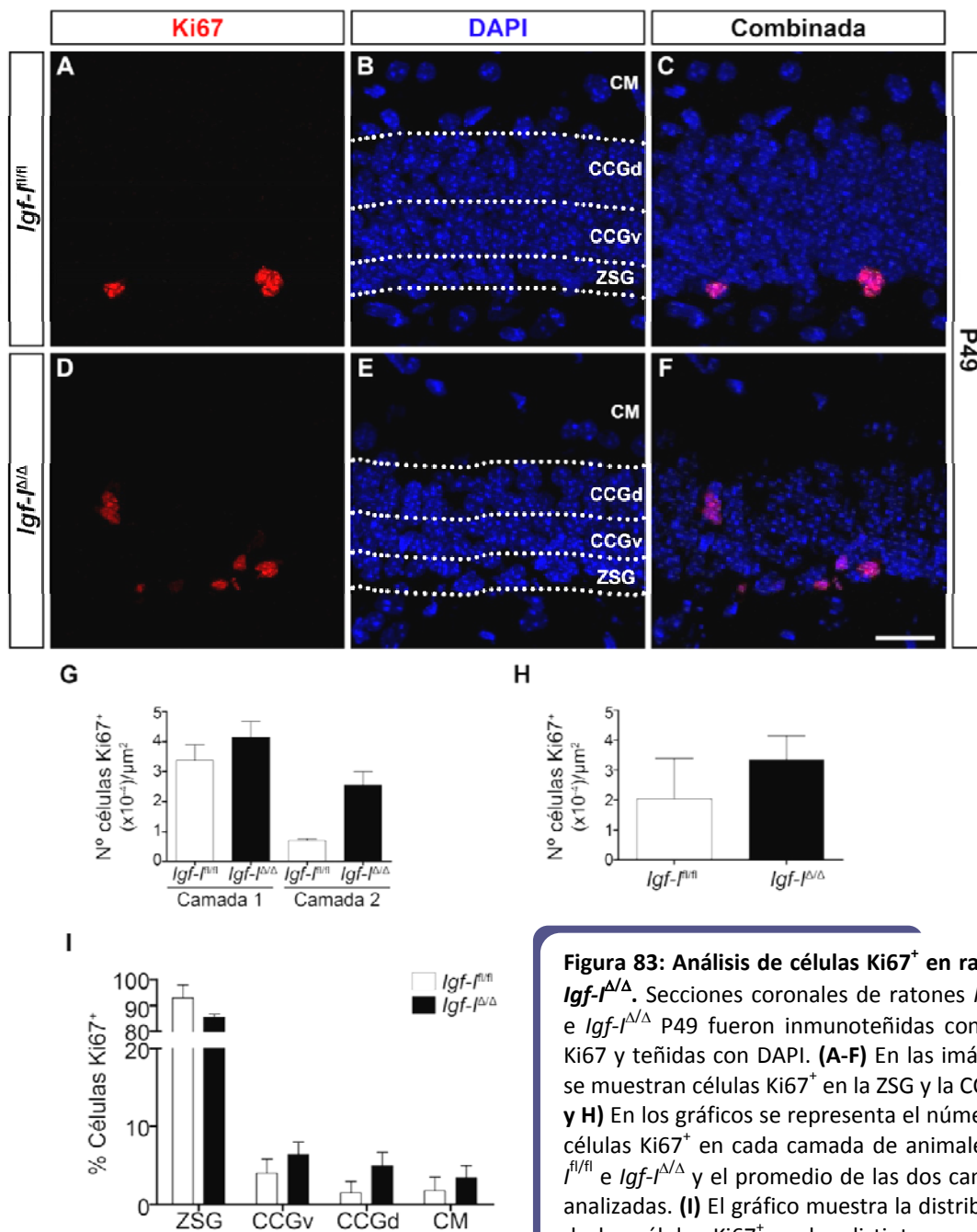


Figura 83: Análisis de células Ki67⁺ en ratones *Igf-I^{Δ/Δ}*. Secciones coronales de ratones *Igf-I^{fl/fl}* e *Igf-I^{Δ/Δ}* P49 fueron inmunoteñidas con anti-Ki67 y teñidas con DAPI. **(A-F)** En las imágenes se muestran células Ki67⁺ en la ZSG y la CCG. **(G y H)** En los gráficos se representa el número de células Ki67⁺ en cada camada de animales *Igf-I^{fl/fl}* e *Igf-I^{Δ/Δ}* y el promedio de las dos camadas analizadas. **(I)** El gráfico muestra la distribución de las células Ki67⁺ en las distintas capas del GD en animales *Igf-I^{fl/fl}* e *Igf-I^{Δ/Δ}*. La falta de IGF-I local parece provocar una acumulación de células en ciclo en áreas superiores del GD. Los resultados son la media \pm SEM de 2 animales por genotipo. Barra de escala (F) = 22 μ m. CCGd=capa de células grano, área dorsal; CCGv=capa de células grano, área ventral; CM=capa molecular; ZSG=zona subgranular.

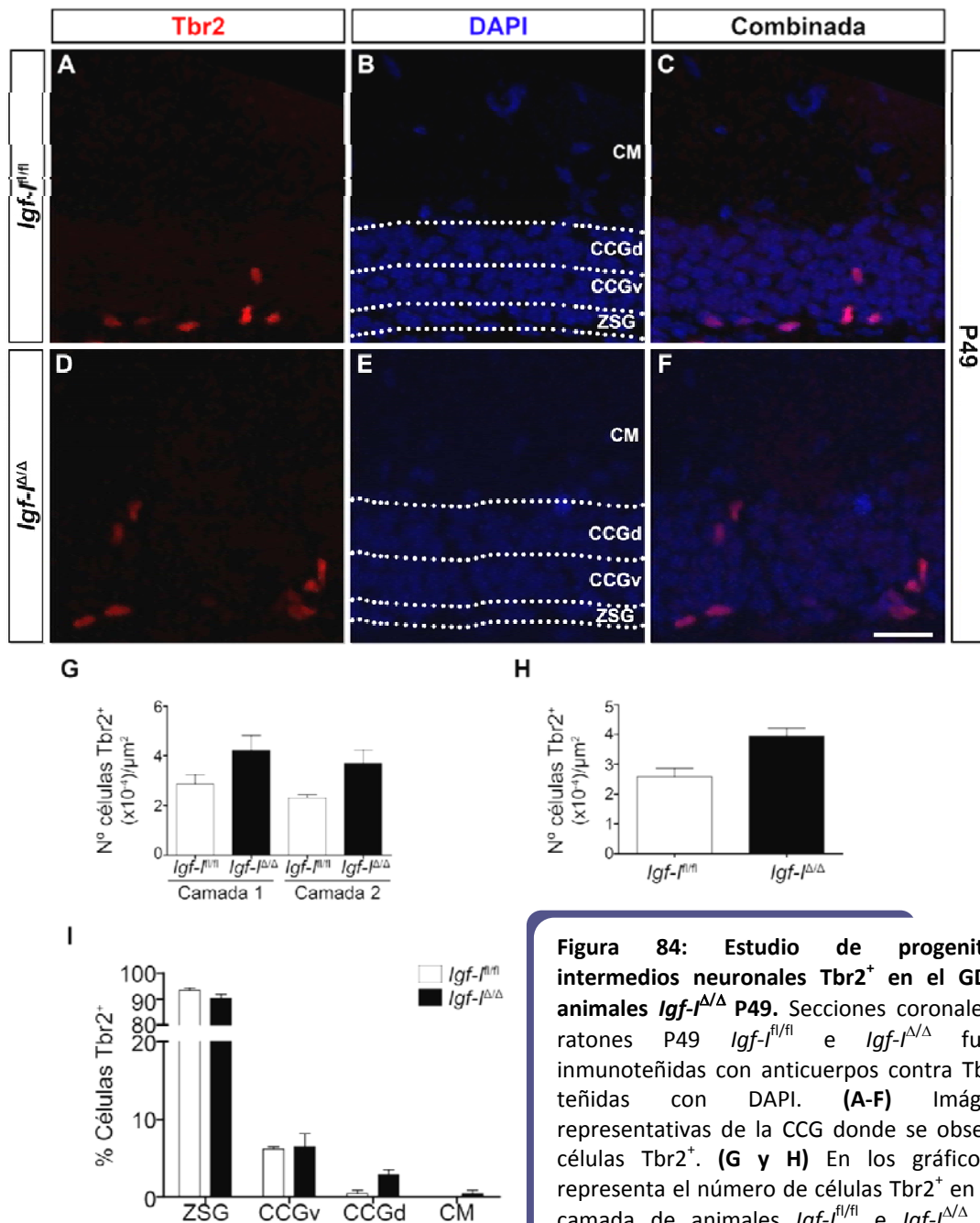
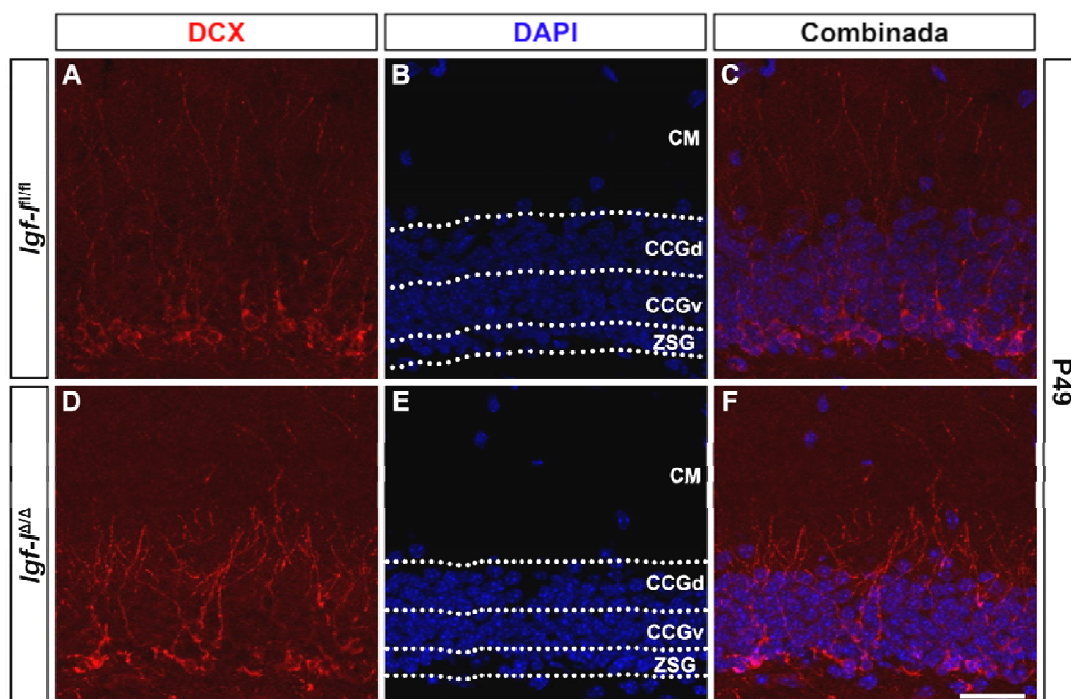
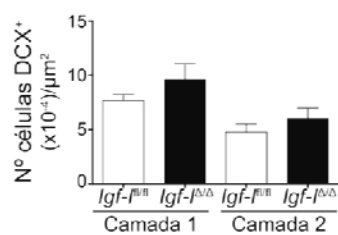


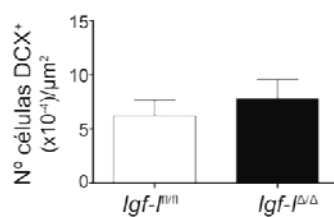
Figura 84: Estudio de progenitores intermedios neuronales Tbr2⁺ en el GD de animales *Igf-I^{Δ/Δ}* P49. Secciones coronales de ratones P49 *Igf-I^{fl/fl}* e *Igf-I^{Δ/Δ}* fueron inmunoteñidas con anticuerpos contra Tbr2 y teñidas con DAPI. (A-F) Imágenes representativas de la CCG donde se observan células Tbr2⁺. (G y H) En los gráficos se representa el número de células Tbr2⁺ en cada camada de animales *Igf-I^{fl/fl}* e *Igf-I^{Δ/Δ}* y el promedio de las dos camadas estudiadas. (I) El gráfico muestra la distribución de las células Tbr2⁺ en las distintas capas del GD de ambos genotipos. En las dos camadas analizadas, se encontró un incremento de progenitores Tbr2⁺ en el área dorsal de la CCG de los animales *Igf-I^{Δ/Δ}* comparado con los animales control. Los resultados son la media ± SEM de 2 animales por genotipo. Barra de escala (F) = 22 μm. CCGd=capa de células grano, área dorsal; CCGv=capa de células grano, área ventral; CM=capa molecular; ZSG=zona subgranular.



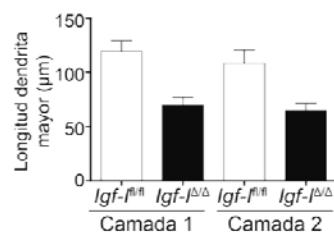
G



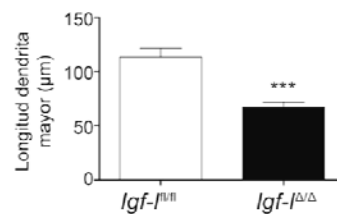
H



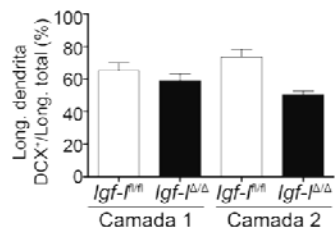
I



J



K



L

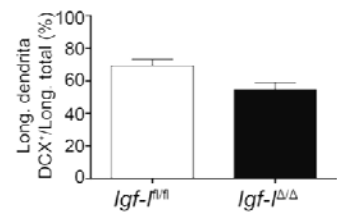
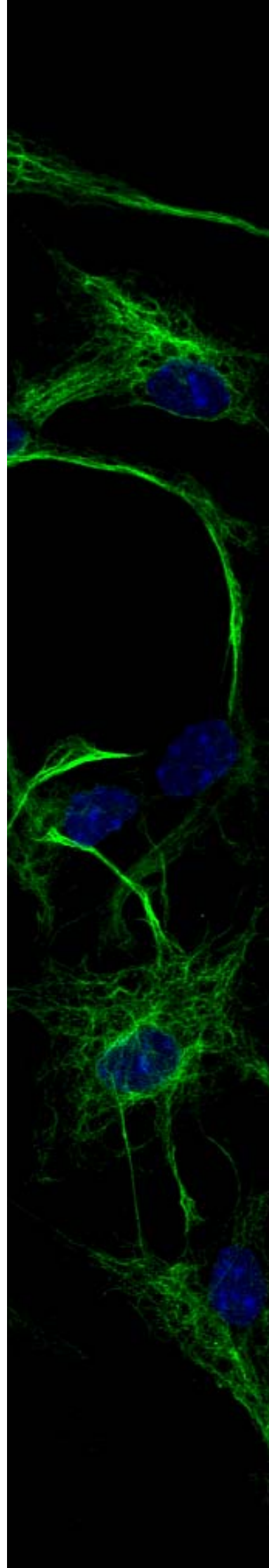


Figura 85: Análisis cuantitativo y morfológico de las neuronas inmaduras DCX⁺ en el GD de animales *Igf-I^{Δ/Δ}*. Secciones coronales de ratones *Igf-I^{fl/fl}* e *Igf-I^{Δ/Δ}* P49 fueron inmunoteñidas con un anticuerpo contra doblecortina (DCX) y teñidas con DAPI. **(A-F)** Imágenes representativas de la CCG de secciones de animales P49 *Igf-I^{fl/fl}* e *Igf-I^{Δ/Δ}* en las que se aprecian las células DCX⁺. Las células DCX⁺ poseían un árbol dendrítico menos organizado radialmente en animales *Igf-I^{Δ/Δ}*. **(G y H)** El gráfico muestra el número de células DCX⁺ en cada camada de animales *Igf-I^{fl/fl}* e *Igf-I^{Δ/Δ}* y el promedio de las dos camadas estudiadas. **(I y J)** En el gráfico se indica la longitud media de la dendrita mayor en animales *Igf-I^{fl/fl}* e *Igf-I^{Δ/Δ}*, como el promedio de las neuronas de cada animal y el promedio de las neuronas de los dos animales por genotipo. **(K y L)** El gráfico muestra el porcentaje en cada camada de la longitud de las dendritas de las células DCX⁺ con respecto a la longitud desde la ZSG hasta la fisura hipocampal de animales *Igf-I^{fl/fl}* e *Igf-I^{Δ/Δ}* y el promedio de las dos camadas. Las dendritas de las neuronas DCX⁺ presentaron una longitud menor en los animales *Igf-I^{Δ/Δ}* comparado con las del *Igf-I^{fl/fl}*. Los resultados son la media ± SEM de 2 animales por genotipo y de 20 neuronas. ***P< 0,001 (t de Student). Barra de escala (F) = 22 μm. CCGd=capa de células grano, área dorsal; CCGv=capa de células grano, área ventral; CM=capa molecular; ZSG=zona subgranular.

Discusión



1. Efecto de FGF-2 y EGF en el mantenimiento y supervivencia de células madre neurales

La combinación de FGF-2 y EGF es crítica para mantener y expandir CMN en cultivos de neuroesferas en flotación (Reynolds y Weiss 1992; Gritti et al. 1996). De hecho, ambos factores son necesarios para obtener el máximo número de células proliferativas en cultivos de CMBOe y CMBOa (Vicario-Abejón et al. 2003; Vergaño-Vera et al. 2009). Sin embargo, ciertos parámetros que afectan al crecimiento de las CMNs, incluyendo la periodicidad de administración de dichos factores, no han sido estandarizados, ni se conocen totalmente los mecanismos celulares ni moleculares por los que FGF-2 y EGF ejercen su acción (Vergaño-Vera et al. 2009; Pastrana et al. 2011). Por ello, nos planteamos estudiar las consecuencias del ayuno parcial de FGF-2 y EGF en la proliferación, progresión del ciclo celular, muerte y diferenciación celular en cultivos de CMN obtenidas a partir del BO embrionario y adulto, así como los mecanismos moleculares implicados en tales procesos.

Los resultados de esta tesis demuestran que el aporte diario de FGF-2 y EGF es vital para mantener la supervivencia y el estado indiferenciado de las CMBO en cultivos de neuroesferas, especialmente en las células de origen adulto, mientras que la proliferación celular parece ser un proceso menos dependiente de la acción continuada de FGF-2 y EGF. Adicionalmente, el ayuno parcial de FGF-2 /EGF en las CMBO induce la muerte celular y mecanismos moleculares asociados al inicio de la diferenciación celular. Nuestro análisis global de expresión génica mostró cambios significativos en 312 genes en respuesta a la menor adición de FGF-2/EGF, entre los que destacan, *Dscaml1*, *Cryab*, *Pla2g7*, *Gpr17* y *Ndr2*. Además, dos vías de señalización implicadas en la diferenciación celular resultaron activadas significativamente en estas condiciones.

1.1. Mecanismos celulares y moleculares asociados a la muerte y la protección celular inducidos por la falta parcial de FGF-2 y EGF

La menor adición de los factores FGF-2 y EGF produjo una reducción del volumen de las neuroesferas y del número de células totales que componían las esferas derivadas tanto de CMBOe como CMBOa en cultivo. Esta reducción, especialmente en cultivos de CMBOa, podría ser debida principalmente al aumento de la muerte celular. Sin embargo, la proliferación celular parece afectarse en menor medida por el ayuno parcial, sólo detectándose ligeros cambios en la proporción de células en cada una de las fases del ciclo celular a lo largo del tiempo y una menor incorporación de BrdU en las neuroesferas de CMBOa y cultivos adherentes (dato no mostrado). Por el contrario, en los cultivos de CMBOe no se observaron cambios consistentes en las fases del ciclo celular ni en el análisis de incorporación de BrdU como consecuencia de la menor adición de factores. Este resultado está parcialmente en contradicción con estudios previos en los que se había demostrado que FGF-2 es necesario para la proliferación celular en el cerebro en desarrollo (Vacarino et al. 1999; Raballo et al. 2000; Mason 2007; Guillemot y Zimmer 2011), así como que FGF-2 y EGF estimulan la proliferación de CMN y progenitores aislados de distintas regiones del cerebro embrionario (Cattaneo y McKay 1990; Vescovi et al. 1993; Vicario-Abejón et al. 1995; Ciccolini y Svendsen 1998; Lillien y Raphael 2000; Lukaszewicz et al. 2002; Maric et al. 2007; Sun et al. 2011). Por otro lado, los cultivos de CMBOe tampoco experimentaron diferencias significativas en los test de muerte celular realizados, a excepción de un aumento de las células TUNEL⁺ en cultivos adherentes expuestos a una

menor frecuencia de administración de FGF-2 y EGF (dato no mostrado). Sin embargo, no podemos descartar que una combinación de efectos menores en la progresión del ciclo y en la muerte celular, no detectados en nuestros análisis, sea responsable del menor tamaño de las neurosféricas de los cultivos de CMBOe en la condición 4d. El distinto comportamiento de las dos poblaciones celulares (las CMBOa son más sensibles al ayuno parcial de factores) podría estar relacionado con el incremento significativo de los niveles de *Fgfr1* y el aumento de la expresión de *Fgf-2* en las CMBOe comparado con las CMBOa. De manera que podría aumentar la actividad de la vía de señalización de FGF-2/FGFR1 en CMBOe, disminuyendo la dependencia de estas células por el FGF-2 exógeno.

En consistencia con la falta de un efecto claro en la proliferación celular en respuesta al ayuno parcial de FGF-2 y EGF, la categoría “división celular” no resultó enriquecida en el análisis de ontologías. A pesar de que en el análisis por *microarray* encontramos subexpresados los genes *Spry4* y *Adm* en la condición 4d, genes que se han relacionado con la proliferación celular (Vergaño-Vera et al. 2010; Sun et al. 2011; Larrayoz et al. 2012), la expresión diferencial de *Adm* no fue confirmada por qPCR. Esto implica que tampoco se observaron evidencias significativas de alteración de la proliferación celular, a nivel transcripcional. No obstante, la ausencia total de FGF-2 y EGF en cultivos de CMBOe y CMBOa provoca un cese de la división celular e induce la diferenciación o muerte celular (Vicario-Abejón et al. 2003; Vergaño-Vera et al. 2009).

Varias de las categorías enriquecidas en el análisis GO estaban relacionadas con procesos de muerte y protección celular. Nuestros resultados, por primera vez, relacionan a *Cryab*, gen que codifica para una chaperona implicada en procesos anti-apoptóticos, neuroprotectores y anti-inflamatorios (Masilamoni et al. 2006; Ousman et al. 2007; Bousette et al. 2010), con la respuesta de las CMBOa ante el ayuno de FGF-2 y EGF. De manera similar, tanto las CMBOe como las CMBOa sobreexpresan *Pla2g7* en estas condiciones, gen involucrado en la rotura de fosfolípidos oxidados tóxicos, los cuales provocan apoptosis y necrosis (Chen et al. 2007; Demos et al. 2008). Otros genes sobreexpresados en ambas poblaciones celulares son *Ndr2* y *Gpr17*, asociados con la protección en respuesta a estrés y daño cerebral (Lecca et al. 2008; Okuda et al. 2008; Chen et al. 2009; Ceruti et al. 2011; Li et al. 2011; Liu et al. 2012). Por el contrario, la expresión de *Calb1* estaba subexpresado en la condición 4d, gen implicado en la supervivencia neuronal y la diferenciación en respuesta a neurotrofinas y FGF-2 y en el mantenimiento de CMN obtenidas de tejido adulto (Vicario-Abejón et al. 1995; Pappas y Parnavelas 1997; Shetty et al. 2004; Beckervordersandforth et al. 2010; Schmidt 2012). Además de estos cambios, el aumento de la expresión de *Fgf-2* y *Egf* en CMBOa y CMBOe, respectivamente, podría ser un mecanismo de retroalimentación para promover su supervivencia y mantenimiento del estado indiferenciado en condiciones de menor aporte exógeno de FGF-2 y EGF. De hecho, una autorregulación, en parte similar, se describió en CMN obtenidas de corteza cerebral embrionaria, en las que la activación de la vía de EGF promueve la expresión de *Sox2*, el cual se une al promotor del *Egfr* favoreciendo directamente su expresión (Hu et al. 2010).

Este aporte continuo de FGF-2 y EGF en cultivos de CMN podría ser solamente una adaptación *in vitro* para mantener la supervivencia y prevenir la muerte celular al crecer las células fuera de su nicho *in vivo* en atmósferas con altas concentraciones de oxígeno. A pesar de que no poseemos datos experimentales al respecto, algunas observaciones sugieren que nuestros hallazgos

podrían tener relevancia *in vivo*. De hecho, no sólo la diferenciación sino también la muerte celular son procesos habituales durante el desarrollo embrionario y la neurogénesis adulta (Diaz et al. 2000; Maric et al. 2007; Sierra et al. 2010). De igual manera, la edad, las lesiones cerebrales o las enfermedades neurodegenerativas afectan negativamente a la supervivencia de las CMN *in vivo*, situación que podría activar diversas respuestas de protección celular (Bernal y Peterson 2011; Tepavcevic et al. 2011). Por ello, nuestros resultados podrían revelar algunos mecanismos implicados en la pérdida de CMN bajo condiciones fisiológicas o patológicas *in vivo*. Esta potencial implicación *in vivo* está apoyada por la expresión de los genes mencionados en el BO adulto (ver Allen Brain Atlas): *Cryab* se expresa abundantemente en todas las capas del BO (a excepción de la ZSE), *Pla2g7* y *Ndr2* se distribuyen por todo el BO (incluyendo la ZSE), *Gpr17* se detecta de forma parcheada por el BO (principalmente en la CCG y en la CPE) y *Calb1* se expresa en neuronas periglomerulares (Hurtado-Chong et al. 2009). En apoyo de esta hipótesis, un estudio reciente ha relacionado a *Cryab* con la supresión de la reacción neuroinflamatoria mediada por astrocitos, en respuesta a la neurotoxicidad inducida por MPTP (del inglés *1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*) en el estriado de ratón (Shao et al. 2013).

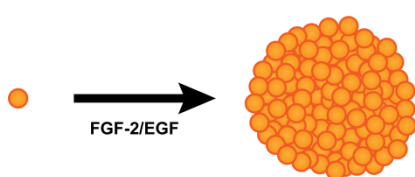
1.2. Inicio de la diferenciación celular en respuesta al ayuno parcial de FGF-2 y EGF: mecanismos moleculares

El ayuno parcial de FGF-2 y EGF durante la fase de proliferación induce un aumento de la diferenciación de las CMBOa como muestra el incremento de los astrocitos GFAP⁺ y neuronas TuJ1⁺ en las neurosféricas de la condición 4d, aunque, por otro lado, tanto las CMBOa como las CMBOe mantuvieron la expresión de genes como *Sox2*, *Pax6* u *Olig2* característicos de CMN (Brill et al. 2009; Roybon et al. 2009; Vergaño-Vera et al. 2009; Han et al. 2012; Thier et al. 2012), así como su potencial neurogénico y gliogénico, no viéndose afectada significativamente su capacidad de producir neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Este inicio de la diferenciación (durante la fase de proliferación) se corroboró con el análisis molecular realizado por *microarray* y por RT-qPCR, donde encontramos un aumento significativo de la expresión de genes relacionados con la diferenciación neuronal, astrocítica y oligodendrocítica, como *Dscaml1*, *S100b*, *Ndr2* y *Gpr17* (Agarwala et al. 2001; Lecca et al. 2008; Okuda et al. 2008; Chen et al. 2009; McIntyre et al. 2010; Ceruti et al. 2011; Li et al. 2011; Liu et al. 2012; Ren et al. 2012). Algunos de estos genes, *Dscaml1*, *Ndr2* y *Gpr17*, también se encontraron sobreexpresados en CMBOe, a pesar de que en esta población los efectos celulares fueron menos evidentes. Otros genes relacionados con diferenciación celular y migración, como *Ttyh1*, *Vcam1*, *Omg*, *Fgfr3*, y *Cdh11* (Wingerd et al. 2004; Taniguchi et al. 2006; Martin et al. 2009; Beckervordersandforth et al. 2010; Stefaniuk et al. 2010; Young et al. 2010; Mishra et al. 2011), también se encontraron sobreexpresados en el *microarray* aunque no fueron analizados por RT-qPCR. Las proteínas codificadas por *Dscaml1* y *Vcam1* participan en procesos de adhesión celular, repulsión y formación de circuitos neuronales (Wingerd et al. 2004; Fuerst y Burgess 2009). De hecho, *Dscaml1* se expresa abundantemente en capas del BO que contienen neuronas diferenciadas como la CCM o la CG (ver Allen Brain Atlas). Nuestros resultados apoyan trabajos previos que proponen un papel importante para las moléculas de adhesión en el mantenimiento y diferenciación de CMN y otras poblaciones de células madre (Doncel-Pérez et al. 2009; Eiselleova et al. 2009; Beckervordersandforth et al. 2010; Lo Sardo et al. 2012). Además, el análisis de vías de señalización

KEGG relacionó la falta de FGF-2 y EGF con la activación de dos vías, una de ellas relacionada con guía axonal que incluía genes como *Dcc*, *Plxnb1* and *Eph* (McIntyre et al. 2010; Gao et al. 2012), lo que confirma el inicio de la diferenciación.

En conclusión, nuestros hallazgos demuestran que el aporte diario de FGF-2 y EGF en cultivos de CMBO es crítico para mantener su supervivencia y estado indiferenciado, especialmente en células derivadas de tejido adulto. De hecho, la adición de FGF-2 y EGF menos frecuentemente induce diferenciación y muerte celular, y quizá también protección celular, asociados a la activación de genes como *Dscaml1*, *S100b*, *Cryab*, *Pla2g7*, *Gpr17* y *Ndr2* y la supresión de genes como *Calb1* (Fig. 86).

A



B

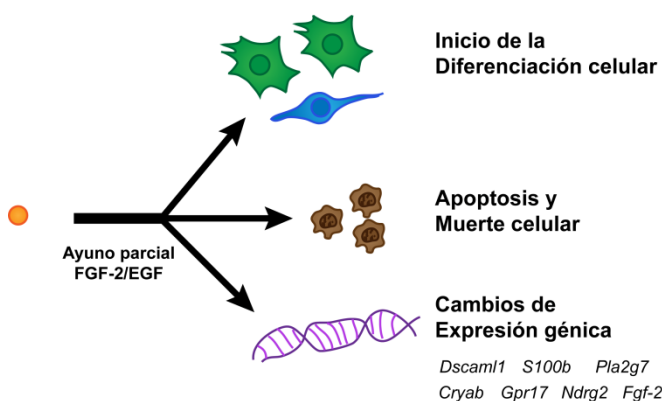


Figura 86: Modelo para explicar el efecto de FGF-2 y EGF en cultivos de CMBO. (A) El aporte continuo de FGF-2 y EGF es necesario para la proliferación y la generación de neurosféricas. **(B)** El ayuno parcial de estos factores promueve la apoptosis y la muerte celular, así como el inicio de la diferenciación celular en cultivos en proliferación de CMBO, observándose cambios en la expresión de genes como *Dscaml1*, *S100b*, *Pla2g7*, *Cryab*, *Gpr17*, *Ndr2* y *Fgf-2*.

2. Papel de BDNF y NT-3 en la maduración de las neuronas derivadas de CMBOe

Las neurotrofinas BDNF y NT-3 intervienen en la maduración neuronal durante el desarrollo embrionario y la neurogénesis adulta, ya que promueven el crecimiento dendrítico y axonal, así como la formación de sinapsis (Vicario-Abejon et al. 1998; Vicario-Abejón et al. 2002; Park y Poo 2013). Sin embargo, sus acciones van a depender del tipo celular y del momento en el que actúen (McAllister et al. 1997; Chiaramello et al. 2007; Petridis y El Maarouf 2011). Los resultados obtenidos en esta tesis indican que BDNF promueve la maduración morfológica de neuronas GABAérgicas y dopaminérgicas derivadas de CMBOe, sin afectarse la supervivencia celular, aparentemente de un modo secuencial: primero, promoviendo el crecimiento de un mayor número de neuritas y, a continuación, favoreciendo la eliminación de algunas neuritas y el crecimiento de otras. Además, BDNF afecta a la formación de sinapsis, aumentando el número y tamaño de los botones sinápticos.

2.1. Efecto de BDNF y NT-3 en la maduración morfológica

El cultivo de neuronas obtenidas a partir de CMBOe resulta una herramienta útil para estudiar la diferenciación y maduración neuronal de los distintos tipos de neuronas formadas en el BO, así como las moléculas implicadas en ello. Gran parte de las neuronas obtenidas a partir de CMBOe en cultivo son de tipo GABAérgico. Este hecho está en consistencia con la gran producción de interneuronas GABAérgicas que se producen en el BO durante el periodo embrionario y adulto (Vergaño-Vera et al. 2006; Díaz-Guerra et al. 2013). Además, las CMBOe también diferencian en menor medida a neuronas dopaminérgicas (Vergaño-Vera et al. 2006; Díaz-Guerra et al. 2013). Sin embargo, se obtuvo una proporción muy baja de células glutamatérgicas Tbr1⁺ y Tbr2⁺ (Mendez-Gomez et al. 2011; Mizuguchi et al. 2012), hecho sorprendente ya que a la edad en la que se obtienen las CMBO (E13,5), en el BO *in vivo* se producen una gran cantidad de neuronas de ese tipo (Weinandy et al. 2011; Díaz-Guerra et al. 2013). Esta menor producción de neuronas glutamatérgicas *in vitro* podría deberse a que el medio de cultivo no contenga todas los requerimientos básicos para la supervivencia y maduración de ese tipo neuronal o a un problema en la expresión de estos factores de transcripción (Trb1 y Tbr2) en cultivo.

Resultados previos habían relacionado a las neurotrofinas con un aumento de la supervivencia neuronal (Jones et al. 1994; Ahmed et al. 1995; Sairanen et al. 2005; Bath et al. 2008). Sin embargo, en nuestros cultivos de neuronas derivadas de CMBOe no se observó un aumento de la supervivencia de las neuronas GABAérgicas ni dopaminérgicas debido a la acción de BDNF o NT-3. Por el contrario, nuestros resultados destacan la influencia de las neurotrofinas en la maduración neuronal y sinaptogénesis.

De manera habitual, durante el desarrollo de los circuitos neuronales se forman un número mayor de neuritas de las que, una vez establecidos los contactos sinápticos funcionales, se eliminarán algunas (Zhang y Poo 2001; Shen y Scheiffele 2010; Park y Poo 2013). Este hecho se reprodujo, en cierta medida, en los cultivos control, en los que se observó una disminución significativa del número de neuritas en las neuronas GABA⁺ entre 14 y 21 DIV. Como se ha mencionado, cuando estas neuronas eran cultivadas con BDNF, inicialmente se produjo un aumento de la longitud total y del número de las neuritas, y, posteriormente, se promovió el mantenimiento y crecimiento de las neuritas más largas. Como consecuencia, las neuronas GABAérgicas cultivadas en presencia de BDNF poseían un árbol neurítico más complejo con neuritas mayores y un cuerpo celular más grande. Por el contrario, NT-3 tuvo una actividad menor en estos procesos. Por otro lado, a diferencia de las neuronas GABAérgicas de los cultivos control, las neuronas dopaminérgicas no sufrieron eliminación de neuritas entre el día 14 y 21 DIV, lo que sugiere la existencia de mecanismos distintos de maduración morfológica en función del tipo de neurona. Sin embargo, la presencia de ambas neurotrofinas en los cultivos favoreció la eliminación de las neuritas de las neuronas TH⁺, aunque BDNF también promovió la formación de un árbol neurítico más complejo si bien en menor medida que en las neuronas GABA⁺.

BDNF y NT-3 promueve la formación de dendritas en el BO y en otras áreas del cerebro (McAllister et al. 1997; Vicario-Abejon et al. 1998; Berghuis et al. 2006; Bergami et al. 2008; Imamura y Greer 2009). Sin embargo, como se ha mencionado antes, nuestros resultados muestran que cada

neurotrofina influye de manera específica en función del tipo celular. En esta misma línea, en la corteza cerebral se han descrito efectos opuestos de BDNF y NT-3 en distintas capas, de manera que BDNF estimula el crecimiento dendrítico en neuronas de la capa 4 de la corteza cerebral, mientras que NT-3 lo inhibe. Sin embargo, en neuronas de la capa 6 el efecto observado es el reverso (McAllister et al. 1997). Por otro lado, en neuronas GABAérgicas aisladas a partir de HPs de rata, BDNF promueve el crecimiento de las ramas dendríticas y del axón, mientras que NT-3 solamente de las dendritas. Nuestro análisis morfológico ha permitido conocer en detalle el mecanismo celular que combina crecimiento y eliminación y/o retracción, por el cual BDNF promueve el desarrollo de un árbol dendrítico más complejo a lo largo del tiempo (Fig. 87).

Además, existen trabajos que relacionan a las neurotrofinas con el desarrollo axonal en múltiples tipos neuronales (Segal et al. 1995; Martinez et al. 1998; Vicario-Abejon et al. 1998; Alsina et al. 2001; Yamada et al. 2002; Ozdinler y Macklis 2006; Cheng et al. 2011). Nuestro análisis morfológico no nos permitió distinguir entre las dendritas y el axón de las neuronas estudiadas. De hecho, inicialmente numerosos esfuerzos se realizaron para distinguir el axón GABA⁺/MAP2ab⁻ y las dendritas GABA⁺/MAP2ab⁺, como se había descrito en células del HP (Vicario-Abejon et al. 1998). Sin embargo, en las neuronas GABAérgicas derivadas de CMBOe no fue posible distinguir el axón de esa manera, posiblemente debido a que gran parte de las interneuronas GABAérgicas del BO poseen un axón corto o no lo poseen (Merkle et al. 2007; Lledo et al. 2008; Brill et al. 2009; Weinandy et al. 2011). No obstante, sería interesante el uso de marcadores específicos para axones como el anticuerpo anti-Tau, que nos permitiese visualizar el axón, tanto de las neuronas GABAérgicas como del resto de subtipos neuronales, y estudiar en profundidad en el papel de BDNF y NT-3 en el desarrollo del axón de las neuronas del BO.

2.2. Efecto de BDNF y NT-3 en la formación y maduración de sinapsis

Las neurotrofinas también se han relacionado con la regulación de la maduración morfológica y funcional de sinapsis (Martinez et al. 1998; Vicario-Abejon et al. 1998; Collin et al. 2001; Tyler y Pozzo-Miller 2001; Rico et al. 2002; Matsutani y Yamamoto 2004; Sanchez-Huertas y Rico 2011; Mast y Fadool 2012). Nuestros resultados demuestran que BDNF promueve la formación y maduración de sinapsis ya que las neuronas derivadas de CMBOe tratadas con BDNF poseen más botones presinápticos y de tamaños más grandes. Estas neuronas reciben un mayor número de contactos sinápticos proporcional a la mayor longitud dendrítica por lo que no se afecta la densidad de los botones.

Diversos estudios han descrito que las neurotrofinas pueden promover la formación y maduración de sinapsis a través de dos mecanismos. Uno de ellos conllevaría el crecimiento del árbol axonal y dendrítico, lo que incrementaría el número de puntos en los que se podrían establecer sinapsis (Cohen-Cory y Fraser 1995; Vicario-Abejon et al. 1998; Alsina et al. 2001); y esta tesis). La otra posibilidad sería promover *per se* la formación de sinapsis de manera que se aumentaría el número de sinapsis, independientemente de si se incrementa el número de las ramas del axón (Martinez et al. 1998; Vicario-Abejon et al. 1998; Alsina et al. 2001; Rico et al. 2002). Nuestros resultados ilustran un tercer mecanismo por el cual BDNF promueve la maduración de sinapsis que implica un aumento del tamaño del botón, lo que podría indicar una mayor actividad presináptica, ya

que estos botones contienen una cantidad mayor de proteína necesarias para la formación, movilización y/o anclaje de las vesículas presinápticas (Vicario-Abejón et al. 2002). Para analizar la funcionalidad de las neuronas obtenidas en presencia de BDNF, sería necesario realizar registros electrofisiológicos o se podrían realizar ensayos con el colorante FM1-43 como una medida indirecta de la liberación de neurotransmisores por las vesículas sinápticas (Collin et al. 2001).

Las neurotrofinas también actúan modulando la parte postsináptica de la sinapsis, afectando a la formación de espinas dendríticas (Tyler y Pozzo-Miller 2001; Matsutani y Yamamoto 2004). Estudios adicionales que permitiesen visualizar las espinas dendríticas con el uso de vectores retrovirales para transducir el gen de la GFP o el PSD95-GFP, para marcar todo la célula o sólo las espinas, respectivamente (Llorens-Martin et al. 2013), serían necesarios para conocer el efecto de BDNF y NT-3 en la maduración postsináptica de las neuronas derivadas de CMBOe.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con BDNF afecta significativamente la maduración sináptica, además de morfológica, de las neuronas derivadas de CMBOe, mientras que NT-3 produjo efectos menores, lo que demuestra que las dos neurotrofinas producen efectos distintos según el tipo celular en el que actúen. De hecho, en estudios en neuronas de HP se vio que BDNF afecta a la maduración funcional de las sinapsis excitadoras e inhibitoras, mientras que NT-3 indujo predominantemente corrientes excitadoras (Vicario-Abejón et al. 1998). De manera que el bajo porcentaje de neuronas glutamatérgicas en cultivos de neuronas derivadas de CMBOe podría explicar la escasa producción de efectos debidos al tratamiento con NT-3, mientras que BDNF estaría influyendo en la maduración sináptica de la población de neuronas GABAérgicas existente en los cultivos.

La detección de los receptores de neurotrofinas TrkB y TrkC en secciones del BO de embriones E14,5, sugiere que BDNF y NT-3 podrían regular la maduración neuronal y el establecimiento de sinapsis durante el desarrollo del BO *in vivo*. De hecho, los ratones KO para TrkB y TrkC muestran una reducción del número de sinapsis en el HP, analizadas por microscopía electrónica (Martinez et al. 1998). Por ello, sería interesante el estudio de secciones de embriones que carecieran de BDNF o NT-3 o inyectar intraventricularmente las neurotrofinas durante el desarrollo embrionario y analizar la sinapsis mediante microscopía electrónica. Desgraciadamente, a pesar de que se pensó en estos experimentos inicialmente, no ha sido posible su realización durante el tiempo de esta tesis.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que BDNF promueve la maduración morfológica de las neuronas GABAérgicas y, en menor medida, de las dopaminérgicas derivadas de CMBOe. Además, BDNF favorece la formación de sinapsis y la maduración de los botones sinápticos. Sin embargo, NT-3 no parece afectar considerablemente a la maduración morfológica y sináptica de las neuronas GABAérgicas y dopaminérgicas derivadas de CMBO (Fig. 87).

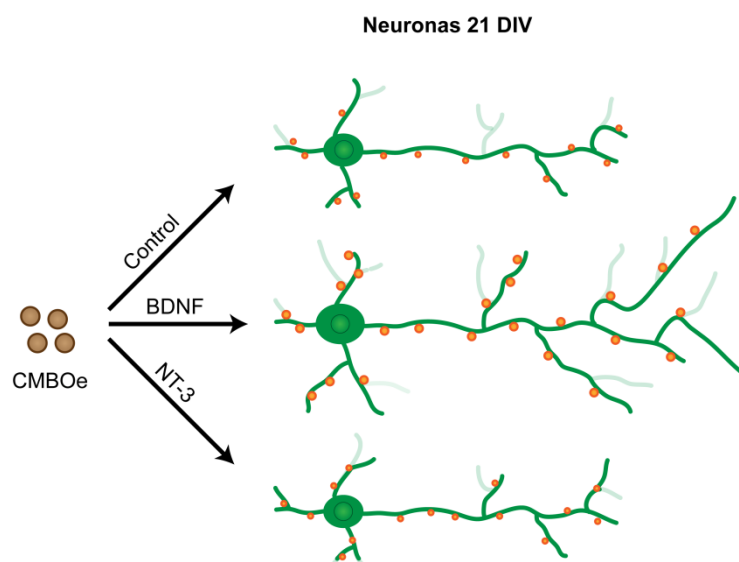


Figura 87: Modelo del papel de BDNF y NT-3 en neuronas derivadas de CMBOe. El dibujo ilustra la maduración morfológica y sináptica de una neurona a partir de CMBOe tras 21 días en cultivo. Los círculos naranjas equivalen a los botones sinápticos y las neuritas sombreadas ilustran la eliminación de las mismas entre 14 DIV y 21 DIV. BDNF promueve la maduración morfológica de neuronas GABAérgicas y, en menor medida, dopaminérgicas derivadas de CMBOe, regulando, inicialmente el crecimiento de un mayor número de neuritas y, después, favoreciendo la eliminación de algunas de ellas y el crecimiento de otras. Además, BDNF estimula la formación y maduración de sinapsis en neuronas derivadas de CMBOe, incrementando el número y el tamaño de los botones sinápticos. Por el contrario, NT-3 tuvo efectos menores en la maduración de estas neuronas.

3. Efecto de IGF-I durante la sinaptogénesis embrionaria en el BO y el HP

Numerosos estudios han demostrado que el factor de crecimiento IGF-I promueve la formación de sinapsis o previene su eliminación en distintas áreas del cerebro (O'Kusky et al. 2000; Cheng et al. 2003; Kakizawa et al. 2003). Sin embargo, los resultados de cultivos de neuronas del BO y el HP presentados en esta tesis sugieren que IGF-I es necesario para la eliminación de botones sinápticos en el BO y en el HP durante algunos estadios del desarrollo embrionario.

Nuestros resultados de puesta a punto de cultivos de neuronas derivadas del BO y del HP de embriones E18,5 (Fig. 15 de Material y Métodos), muestran la distinta dependencia de ambas poblaciones celulares a la insulina. De hecho, las neuronas derivadas del BO fueron capaces de sobrevivir y diferenciarse en neuronas maduras incluso en ausencia total de insulina (a excepción de la cantidad de insulina presente en el suero). No obstante, la adición de BDNF favoreció la supervivencia celular en los cultivos de BO. Por el contrario, cuando las neuronas eran obtenidas a partir del HP, la ausencia de insulina en el medio de cultivo comprometía significativamente la supervivencia neuronal, la cual mejoró por la adición de BDNF en los cultivos. Este menor requerimiento de la insulina por las células del BO, podría ser debido a que estas neuronas producen más insulina que las de HP (Fernandez y Torres-Aleman 2012). Por ello, el posterior análisis de neuronas obtenidas a partir de ratones WT y KO para *Igf-I*, se realizó en ausencia total de insulina, para evitar las interacciones cruzadas que pudieran darse con el IGF-IR, y sólo en los cultivos de HP se añadió BDNF para favorecer la supervivencia neuronal.

Nuestros resultados indican que la falta de IGF-I en los cultivos obtenidos de embriones KO para *Igf-I*, no comprometía la supervivencia neuronal ya que el número de neuronas MAP2ab⁺ observadas fue similar en los cultivos del BO de embriones KO y en los WT, e incluso se incrementó en el caso del HP de embriones KO comparado con los WT. Este resultado está en oposición a otros trabajos que demuestran que IGF-I favorece la supervivencia celular, ya que inhibe la apoptosis, bloqueando la expresión de genes proapoptóticos, en múltiples tipos celulares del SN como en células de corteza, células del Purkinje y neuronas del GD, entre otras (Gago et al. 2003; Hodge et al. 2007; Liu et al. 2009; Croci et al. 2010). En los cultivos realizados a partir del BO tanto WT como KO, la mayoría de las neuronas obtenidas fueron GABA⁺ (85-90%), lo que podría estar relacionado con la mayor proporción de neuronas GABAérgicas en el BO a esa edad (Díaz-Guerra et al. 2013). En los cultivos de HP, la proporción de neuronas GABAérgicas fue menor que en el BO, alrededor de un 70%, aunque bastante superior a lo reportado en otros estudios o lo observado *in vivo* (Soriano et al. 1994; Vicario-Abejon et al. 1998). Esta mayor supervivencia de neuronas GABAérgicas, podría deberse a que la falta de insulina podría comprometer en mayor medida la viabilidad y diferenciación de las neuronas glutamatérgicas favoreciendo así a las GABA⁺ y/o a que BDNF, en estas condiciones, favorecería específicamente la supervivencia y diferenciación de las neuronas GABAérgicas hipocampales. Sin embargo, para identificar la población glutamatérgica en los cultivos, sería necesario un análisis con Tbr1 o Tbr2 (Mendez-Gomez et al. 2011; Mizuguchi et al. 2012) para marcar las neuronas glutamatérgicas en los cultivos de BO y de Prox1 (Iwano et al. 2012) para marcar las células grano del HP.

En las neuronas glutamatérgicas derivadas del BO de embriones KO, se incremento tanto el número como la densidad de botones vGlut1⁺ por neurona. Adicionalmente, en los cultivos de HP, debido al mayor porcentaje de neuronas glutamatérgicas y/o a efectos sobre las neuronas GABAérgicas, la falta de IGF-I también produjo un aumento de los botones sinaptofisina⁺. Estos resultados obtenidos en cultivos del ratón KO sugieren que IGF-I es necesario para la eliminación de sinapsis glutamatérgicas en el BO, así como, probablemente también GABAérgicas, en el HP durante el desarrollo embrionario (Fig. 88).

Sin embargo, los resultados obtenidos mediante el análisis realizado a partir de extracto de proteínas por Western Blot o en secciones del BO y el HP de ratones WT y KO inmunoteñidas contra sinaptofisina y vGlut1 no mostraron diferencias entre ambos genotipos en los marcadores de sinapsis. Esta discrepancia entre los análisis *in vivo* y los realizados en cultivo, podría deberse a que *in vivo* la falta de IGF-I podría ser compensada por otros miembros de la familia como la insulina o el IGF-II (Ishii 1989; Choi et al. 2005), ya sea por unión a sus receptores específicos o al IGF-IR mimetizando el efecto de IGF-I (Bondy y Cheng 2004). No obstante, sería interesante un análisis más detallado a nivel del botón para determinar el papel de IGF-I *in vivo*, así como el estudio del desarrollo del axón de las neuronas en cultivo. Además, para comprobar la especificidad del efecto producido por la falta de IGF-I en las neuronas derivadas del BO y el HP de embriones KO, se han diseñado experimentos de “rescate”, para determinar si la aplicación de IGF-I exógeno es capaz de revertir la falta de IGF-I en estos cultivos de ratones KO.

Nuestros resultados muestran, por primera vez, la implicación de IGF-I en la eliminación de sinapsis en el BO e HP. Hasta la fecha, como se ha descrito en la introducción de esta tesis, numerosos estudios, tanto de ganancia como de pérdida de función, han demostrado que IGF-I promueve la formación de sinapsis en determinadas áreas del cerebro como el HP, el cerebelo o la corteza, entre otras (O'Kusky et al. 2000; Cheng et al. 2003; Kakizawa et al. 2003; Trejo et al. 2007; Cao et al. 2011; Corvin et al. 2012). Sin embargo, el efecto de IGF-I promoviendo la formación de sinapsis es específico de determinados tipos celulares como se ha observado en el HP de ratones adultos, donde IGF-I produce un aumento de la densidad de espinas en las dendritas basales de las neuronas piramidales de CA1 pero no afecta a las neuronas grano del GD ni a las neuronas de CA3 (Poe et al. 2001; Glasper et al. 2010). Estos estudios y los resultados aportados en nuestro trabajo demuestran que IGF-I podría tener un efecto dual en la formación de sinapsis, influyendo tanto en su formación como en su eliminación, dependiendo del tipo celular y el momento del desarrollo en el que actúe. De hecho, nuestro análisis con partículas retrovirales de las nuevas neuronas generadas en el GD postnatal, muestra una menor complejidad morfológica de las neuronas de ratones KO (ver más detalles a continuación) que podría conllevar un menor desarrollo funcional y sináptico. Proponemos, por tanto, que IGF-I sería necesario para la maduración sináptica de las neuronas grano del GD postnatal-adulto, mientras que en las etapas finales del desarrollo embrionario, podría favorecer la eliminación de sinapsis en neuronas del HP.

Cultivo primario de Neuronas 14

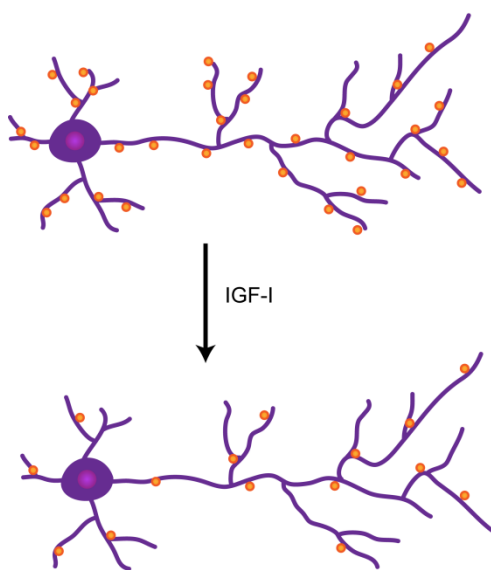


Figura 88: Modelo del efecto de la delección de *Igf-I* en cultivos de neuronas de BO e HP. El dibujo ilustra la maduración morfológica y sináptica de una neurona tras 14 días en cultivo. Los círculos naranjas equivalen a los botones sinápticos. IGF-I podría regular la eliminación de botones sinápticos en neuronas obetenidas del BO y en el HP de embriones E18,5, ya que en su ausencia, aumenta el número de dichos botones.

Adicionalmente, sería interesante conocer qué vías de señalización activa IGF-I para promover la eliminación de botones sinápticos en el BO y en el HP, mediante el uso de anticuerpos contra las distintas enzimas o los efectores de las vías de señalización de IGF-I, como Akt, CREB o mTOR y experimentos de ganancia y pérdida de función. Por ejemplo, estudios recientes han demostrado que en neuronas de corteza de neonatos, el tratamiento con IGF-I, produce un aumento de la fosforilación de MAP y de Akt, mecanismos por los cuales IGF-I promovería un aumento de la sinapsis (Corvin et al. 2012). CREB y mTOR también se han relacionado con alteraciones en la maduración morfológica y sináptica de neurona del hipocampo y la corteza (Sanchez-Huertas y Rico

2011; Pun et al. 2012; Zhou et al. 2013). Nuestros resultados *in vivo* en ratones postnatales-adultos muestran que la falta de IGF-I podría aumentar la fosforilación de CREB. Por ello, nos parece interesante analizar si la fosforilación de CREB está alterada en los cultivos de neuronas hipocampales, y del BO, durante la eliminación de sinapsis.

4. Papel de IGF-I durante la neurogénesis hipocampal postnatal-adulta

IGF-I es necesario para la correcta formación de las capas del BO durante el periodo embrionario (Pichel et al. 2003; Vicario-Abejón et al. 2003) y, durante el periodo postnatal y adulto, promueve la salida de los neuroblastos desde la ZSV hasta el BO y su correcto posicionamiento en las distintas capas del BO (Hurtado-Chong et al. 2009). Por otro lado, no se han detectado alteraciones en la estructura anatómica del HP de embriones E18,5 carentes de *Igf-I* (Vicario-Abejón et al. 2004), mientras que en ratones adultos KO para IGF-I, se ha observado una reducción del volumen del HP y una pérdida de neuronas parvoalbúmina en el mismo (Beck et al. 1995). Adicionalmente, los niveles séricos de IGF-I regulan el efecto neurogénico producido por el ejercicio físico (Trejo et al. 2008; Llorens-Martín et al. 2010). Sin embargo, no se conocían en detalle los estadios celulares ni los mecanismos por los que IGF-I afecta la neurogénesis en el GD del HP adulto.

Nuestros resultados demuestran que la falta de IGF-I produce una acumulación de progenitores neuronales Tbr2⁺ en el GD. Además, el IGF-I es necesario para el crecimiento de las dendritas de las neuronas DCX⁺, así como para el correcto posicionamiento y, probablemente maduración, de las neuronas grano del GD del HP.

4.1. Efecto de IGF-I en el HP de ratones postnatal-adulto

Nuestro análisis inmunohistológico con anticuerpo contra IGF-I e IGF-IR, verifican la presencia tanto de IGF-I y su receptor en el GD adulto como ya se había determinado mediante hibridaciones *in situ* (Bondy et al. 1990; Bartlett et al. 1991; Ye et al. 1997). Además, observamos que gran parte de las células en las que se detectaba IGF-I, eran parvoalbúmina⁺, lo que podría explicar la pérdida de este tipo de neuronas en el HP de ratones adultos carentes de IGF-I (Beck et al. 1995). La colocalización tanto del IGF-I como del IGF-IR con el marcador Prox1, sugiere la influencia de IGF-I en la maduración de las células grano del GD.

Para estudiar la implicación del IGF-I en la neurogénesis hipocampal adulta, se eligió un modelo de ratones KO, los cuales carecían de IGF-I de forma global en todo el organismo. De las dos cepas utilizadas (ver Material y Métodos), sólo los ratones en fondo genético MF1 fueron capaces de sobrevivir después del parto, como ya se había descrito previamente (Liu et al. 1993; Pichel et al. 2003; Hurtado-Chong et al. 2009). Para mejorar la supervivencia postnatal, se intentó generar un ratón condicional que careciera de IGF-I exclusivamente en el SN y así vencer el menor desarrollo pulmonar que probablemente causaba la muerte neonatal de los ratones KO (Pichel et al. 2003). La generación de este ratón condicional se discutirá ampliamente más adelante.

Los ratones carentes de IGF-I que sobrevivían hasta las 7 semanas de vida, presentaban una reducción del tamaño corporal de más de dos veces, similar a la descrita (Baker et al. 1993). Estos ratones además poseían una reducción del tamaño cerebral aunque las estructuras cerebrales

estaban preservadas. En el HP también se observó una reducción proporcional del tamaño en el asta de Ammón y en el GD aunque todas las capas que los componen estaban presentes.

Por todo ello, IGF-I es un factor crítico para el crecimiento somático durante el desarrollo embrionario y postnatal.

4.2. Efecto de IGF-I en la proliferación celular en el GD

Los análisis de BrdU y P-Histona H3 en secciones de animales WT y KO, muestran que la carencia IGF-I no afecta la fase S ni M del ciclo de las células del GD a la edad de P49. Sin embargo, la falta de IGF-I provocó una acumulación de células retenidas en ciclo Ki67⁺, las cuales se distribuían en capas más externas de la CCG e incluso en la CM, posiciones aberrantes para este tipo de células. Para analizar en profundidad la proliferación celular, obtuvimos CMHP de ratones postnatales WT y KO que se mantuvieron en cultivo mediante la adición de FGF-2 y EGF. En estas condiciones, las células de ambos genotipos fueron capaces de formar neuroferas, aunque de menor tamaño en los cultivos KO, que expresaban marcadores de CMN como nestina y Sox2 (McKay 1997; Suh et al. 2007; Hodge et al. 2012). Cuando analizamos las células Ki67⁺ y BrdU⁺ en neuroferas, tras un pulso de BrdU de 30 minutos, en cultivos poblacionales (a alta densidad) detectamos un aumento en el porcentaje de ambos marcadores en las células derivadas de ratones KO comparado con los cultivos control, incremento que fue bloqueado por la administración de IGF-I exógeno. Este aumento de la proliferación parecía estar en contradicción con el menor tamaño de las neuroferas de los cultivos KO. Sin embargo, en cultivos poblacionales el tamaño de las neuroferas no siempre refleja la capacidad de proliferación celular, ya que puede producirse agregación entre neuroferas (Pastrana et al. 2011). Por ello, realizamos estudios de análisis clonal para evaluar el impacto de la falta de IGF-I a nivel de célula única. De esta manera, observamos que las células únicas obtenidas de ratones KO no tenían afectada su capacidad de autorrenovación, ya que no se observaron diferencias en el porcentaje de esferas formadas comparado con los cultivos WT. Por el contrario, las células únicas de cultivos KO, dieron lugar después de 14 días en cultivo clonal a neuroferas de tamaños mayores, lo que podría reflejar un aumento de la proliferación de progenitores. En conjunto, nuestros resultados *in vivo* e *in vitro* demuestran que la falta de IGF-I induce y/o mantiene la proliferación de progenitores en el GD mientras que no se observaron cambios que nos permitan concluir si se afecta la autorrenovación de las CMHP (ver a continuación). Además, la adición de IGF-I exógeno en los cultivos es capaz de compensar la falta de IGF-I endógeno en cultivo, revirtiéndose el efecto observado en las células obtenidas a partir de ratones KO.

Estos resultados parecen estar en contradicción con los observados en la corteza cerebral de embriones E14,5 de rata, en los que se ha observado que la administración de IGF-I promueve la salida de las células desde G₁ para entrar en mitosis (Mairet-Coello et al. 2009). De hecho, la sobreexpresión de IGF-I produce un engrosamiento del neuroepitelio del ratón debido a un incremento en el número de células proliferativas (Popken et al. 2004). Por el contrario, en ratones que carecen de IGF-I se observó un incremento en el número de células proliferativas en el GD (Cheng et al. 2001). Adicionalmente, IGF-I estimula la proliferación de CMBOe, mientras que cuando las CMBO son obtenidas de embriones KO para IGF-I no se observan diferencias en el número de células que incorporó BrdU (Vicario-Abejón et al. 2003). Todo ello, junto con los resultados expuestos

en esta tesis, ponen de manifiesto que, al igual que se ha descrito para el papel de IGF-I en la sinaptogénesis del BO y el HP, IGF-I podría afectar la proliferación celular de manera diferente en función del tipo celular y del momento del desarrollo.

4.3. Efecto de IGF-I sobre la población de células madre y progenitores en el GD

La falta de IGF-I en ratones postnatales-adultos, afectó levemente a la población de células madre *in vivo* ya que los animales KO poseían un número de células Sox2⁺ ligeramente inferior que los animales WT y la morfología de las células nestina⁺ parecía menos compleja en los animales KO. Por el contrario, los animales KO tenían un mayor número de progenitores que se localizaban en capas más externas de la CCG comparado con los animales WT. Los animales KO mostraron un ligero aumento en el número de progenitores Pax6⁺, probablemente aún no determinados a un fenotipo neuronal (Hodge et al. 2012; Hsieh 2012), tanto a las tres semanas de edad postnatal como siete. Pero fue en los progenitores neuronales Tbr2⁺ (Hodge et al. 2012; Hsieh 2012) en los que se observó un incremento significativo en los animales KO comparado con sus hermanos WT. No es descartable que esta acumulación de progenitores podría conllevar un agotamiento de la población de células madre compatible, en un principio, con los dos modelos descrito para la división de las CMN del GD. De acuerdo con el modelo de Bonaguidi et al., la falta de IGF-I podría promover la división simétrica de células madre para dar lugar a dos progenitores, en detrimento de la división asimétrica que formaría una CMN y un progenitor o las divisiones simétricas que generarían dos CMNs (Bonaguidi et al. 2011). Por otro lado, según el modelo planteado por Encinas et al., la ausencia de IGF-I provocaría la continua activación de las CMNs quiescentes que tras una serie de divisiones neurogénicas darían lugar a astrocitos (Encinas et al. 2011). Este segundo modelo, implicaría una acumulación de astrocitos en el GD de los ratones KO. Sin embargo, no se ha observado un incremento en la población de células GFAP⁺ en ratones KO (dato no mostrado), aunque la escasez de marcadores específicos de astrocitos, nos impide poder rechazar totalmente esa teoría. No obstante, sería informativo inmunotemplar secciones de animales WT y KO con anticuerpos contra S100β, otro marcador de astrocitos. Además, para determinar si la falta de IGF-I produce un agotamiento prematuro de la población de células madre neurales sería interesante analizar secciones de animales KO de edades más avanzadas o la realización de análisis clonales sucesivos para comprobar si las CMHP pierden la capacidad de autorrenovación a lo largo de los pases.

Esta acumulación de progenitores no implica obligatoriamente un aumento de las neuronas diferenciadas. De hecho, de manera fisiológica sólo una parte de los progenitores generados se integran en el circuito como neuronas maduras mientras que el resto sufren apoptosis y son eliminados por fagocitosis (Sierra et al. 2010). A pesar de que en los animales analizados no hemos observado aumento de la muerte por apoptosis medida mediante la tinción TUNEL o con anticuerpos anti-caspasa (dato no mostrado), la rápida eliminación de las células apoptóticas por fagocitosis puede dificultar su detección en tejido, lo que nos impide descartar totalmente esa posibilidad. Sin embargo, la falta de IGF-I no induce apoptosis en cultivo como demuestran el estudio realizado con Anexina en CMHP. Por el contrario otros estudios han descrito que la falta de IGF-I provoca un aumento del número de células muertas y una menor supervivencia de las neuronas formadas en el GD (Cheng et al. 2001; Lichtenwalner et al. 2006; Liu et al. 2009).

Nuestros resultados indican que IGF-I es necesario para el mantenimiento de la población de células madre del GD *in vivo*, ya que su ausencia podría provocar la activación de las células quiescentes y/o un mayor número de células en ciclo. Además, IGF-I también regula el posicionamiento de los progenitores neuronales (Fig. 89).

4.4. Efecto de IGF-I sobre la diferenciación neuronal en el GD

Al mismo tiempo, la falta de IGF-I impide la correcta maduración de las neuronas grano del GD como demuestra la menor complejidad morfológica que presentan las neuronas inmaduras DCX⁺ y las neuronas Prox1⁺ en los experimentos con retrovirus en el GD de los ratones KO. Esta reducción en la complejidad de los árboles dendríticos neuronales no es consecuencia del menor tamaño del GD, ya que como indica el análisis de la distancia que ocupan las dendritas DCX⁺ con respecto a la distancia desde la ZSG hasta la fisura hipocampal, las dendritas de las neuronas de los animales KO ocupan un porcentaje menor del espacio disponible para crecer. Además, las neuronas grano del GD debido a la falta de IGF-I ocupan posiciones ectópicas fuera de la CCG. Este posicionamiento ectópico puede ser debido a que el incremento de progenitores Tbr2⁺ causa acúmulos de los mismos en esas zonas donde se iniciaría la maduración neuronal posterior o a que IGF-I es necesario para la correcta migración de los neuroblastos hasta alcanzar su posición definitiva. De hecho, la falta de IGF-I se ha asociado con una acumulación de progenitores en la ZSV que no pueden llegar hasta el BO (Hurtado-Chong et al. 2009), así como con fallos en la migración de otros tipos celulares (Onuma et al. 2011; Li et al. 2012). Para analizar ese efecto en la migración, se realizaron cultivos de explantes del HP de ratones WT y KO, en los cuales sólo se observó un crecimiento de fibras no siendo posible evaluar la migración celular en ellos (dato no mostrado).

Adicionalmente, se intentó determinar el momento en el que IGF-I es necesario para el desarrollo del HP mediante el análisis de secciones de embriones E18,5 inmunoteñidas contra Prox1. A esa edad, los embriones KO parecían poseer un ligero retraso en la formación de las hojas ventral y dorsal de la CCG del GD (dato no mostrado) pero no se realizó un análisis detallado de este posible efecto. Sin embargo, en estudios en los que se elimina el IGF-IR en el SN, se observan una gran alteración del GD en animales P0 que se mantiene en animales adultos, en los cuales no es posible distinguir las dos hojas de la CCG (Liu et al. 2009). Además, en el ratón KO global, tampoco se observó un fenotipo muy marcado en el GD cuando se inmunotifieron contra Prox1 secciones de ratones P5 (dato no mostrado). Por ello, el IGF-I parecía ser un factor más crítico en el desarrollo postnatal del GD que durante la etapa embrionario o postnatal temprana. No obstante, el marcaje contra Ki67 podría resultar útil para marcar las células en ciclo y evaluar el efecto de IGF-I en las distintas zonas de migración formadas antes y después del nacimiento.

Además, creemos importante evaluar la maduración sináptica de las nuevas neuronas formadas, mediante el análisis de las espinas dendrítica en las células transducidas con la GFP (Zhao et al. 2006; Jang et al. 2013), para discernir si IGF-I es necesario para regular la sinaptogénesis en el GD de animales postnatales-adultos y comparar este posible efecto con su actividad en la eliminación de sinapsis discutido anteriormente (apartado 3). Sin embargo, el nivel de expresión de la GFP en los vectores utilizados no permitió la visualización de las espinas en el microscopio confocal. Para mejorar esta expresión se ha desarrollado en nuestro laboratorio un vector que expresa la GFP bajo el

promotor CAG, siendo así más estable. También sería interesante el uso de otros vectores que transducen el gen PSD95 para marcar específicamente las espinas (Llorens-Martin et al. 2013). Paralelamente, la falta de IGF-I podría afectar a la parte presináptica, por lo que el estudio de los axones que hacen sinapsis con las neuronas grano mediante la tinción de Timm o el uso de anticuerpos como el anti-Tau (Enomoto et al. 2009), podrían aportar información relevante para determinar el papel de IGF-I en maduración neuronal del GD a nivel pre y postsináptico.

Se ha descrito que la falta de IGF-I sistémico, debido a la delección de IGF-I en el hígado, afecta a la maduración neuronal en el GD, relacionándose este fenotipo con déficit cognitivos (Trejo et al. 2007). Desgraciadamente, la escasa supervivencia postnatal de los ratones KO para *Igf-I*, nos ha impedido analizar las consecuencias de la falta de IGF-I a nivel comportamental y evaluar si los efectos observados en la acumulación de progenitores y en la maduración y posicionamiento neuronal, podrían conllevar alteraciones en el comportamiento del animal.

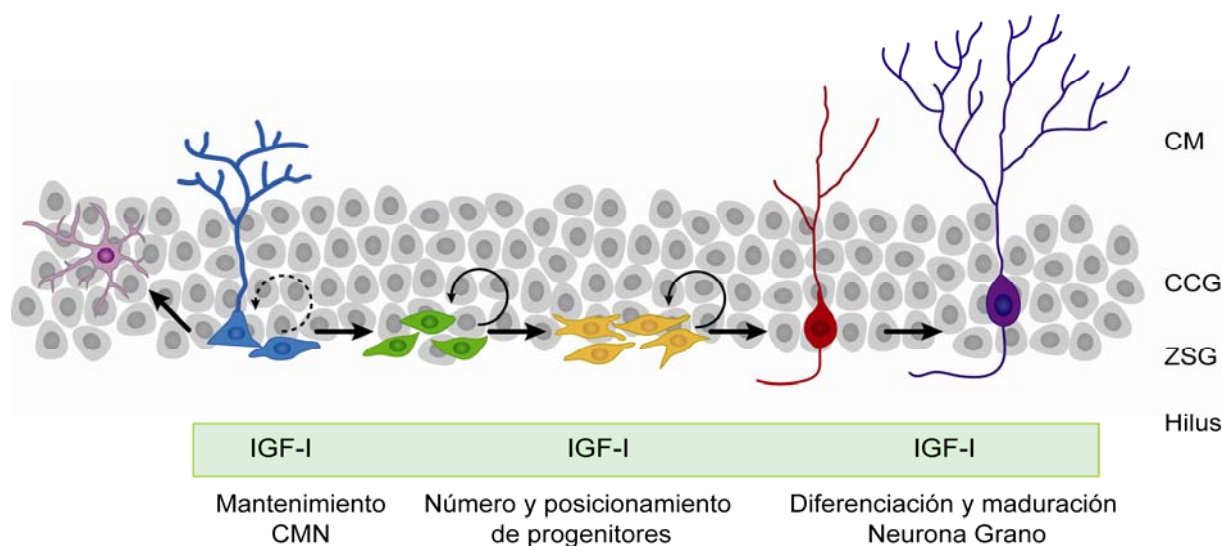


Figura 88: Modelo del papel de IGF-I durante la neurogénesis hipocampal adulta. El dibujo representa la CCG del GD del HP con los distintos estadios celulares que son necesarios para originar una célula grano. El IGF-I parece ser necesario para la correcta generación de progenitores a partir de CMNs y su posicionamiento en la CCG, así como para la diferenciación, posicionamiento y maduración morfológica de las neuronas grano del giro dentado.

4.5. Mecanismos implicados en el efecto de IGF-I durante la neurogénesis adulta

Además, quisimos determinar que el efecto observado en la maduración neuronal en el GD como consecuencia de la falta de IGF-I era específico de la unión de IGF-I a su receptor. Por ello, se intentaron realizar inyecciones estereotáxicas en el GD con partículas retrovirales para transducir un vector que portaba el gen de la enzima CRE, además del gen de la GFP como reportero, en ratones de la línea *Igf-IR loxP* (amablemente cedidos por los Drs. Ana Fernández e Ignacio Torres del Instituto Cajal, CSIC, Madrid) (Dietrich et al. 2000). De esta manera, conseguiríamos bloquear la expresión del receptor de IGF-I en aquellas células transducidas con el vector. Sin embargo, una reacción

inflamatoria como consecuencia de la inyección impidió la visualización de células GFP⁺. No obstante, este experimento será repetido en los próximos meses.

Una de las vías activadas por la unión de IGF-I a su receptor, es la vía de la PI3K. Esta vía se ha relacionado con la proliferación, migración y diferenciación de los progenitores neurales (Otaegi et al. 2006; Hurtado-Chong et al. 2009; Fernandez y Torres-Aleman 2012). Por ello, analizamos los niveles de Akt y P-Akt por Western blot como índice de actividad de la enzima PI3K. Nuestros resultados muestran que la falta de IGF-I no afecta a la activación de Akt de manera general en el HP. Sin embargo, cuando analizamos por inmunohistoquímica uno de los efectores de la vía de la PI3K, el factor CREB (Peltier et al. 2007; Dorey y Amaya 2010), observamos que los animales KO poseían un mayor marcaje para P-CREB, lo que parecía indicar que la falta de IGF-I produce una hiperactivación de CREB como posible mecanismo compensatorio. Estudios en progenitores neurales aislados del HP adulto, han demostrado que la sobreexpresión de Akt o CREB promueve la proliferación celular e inhibe la diferenciación (Peltier et al. 2007). Estos datos apoyan nuestros resultados encontrados en el ratón KO, de manera que el aumento del número de células proliferativas y el menor grado de diferenciación neuronal observado podría ser debido a la activación de CREB. Sin embargo, el mecanismo por el cual es activado CREB debido a la falta de IGF-I aún se desconoce y tampoco descartamos la implicación de otros mecanismos o vías de señalización. De hecho, recientemente se ha publicado que CREB también puede ser fosforilado por la activación de la vía de las MAP quinasa (Yan et al. 2013).

Otro de las moléculas que pueden ser activadas en la vía de la PI3K es mTOR. De hecho, se ha demostrado que la activación de mTOR y de la proteína p70S6K es necesaria para la proliferación de los progenitores neurales (Palazuelos et al. 2012; Paliouras et al. 2012). Además, la activación de mTOR en el HP se ha asociado a alteraciones en la maduración y posicionamiento de las células grano del GD (Enomoto et al. 2009; Kim et al. 2009; Pun et al. 2012; Zhou et al. 2013). Por ello, para profundizar en los mecanismos por los que la falta de IGF-I afecta a la neurogénesis hipocampal sería interesante analizar la activación de mTOR en los ratones KO mediante el uso de anticuerpos específicos.

Por otro lado, quisimos analizar si la falta de IGF-I afectaba otras vías de señalización que no se incluyen dentro de las canónicas para ese factor. La relina es una proteína relacionada con migración y se ha visto que IGF-I puede fosforilar la proteína adaptadora Dab1 de forma similar a la relina para promover la migración de los neuroblastos de la ZSV (Hurtado-Chong et al. 2009). Recientemente, se ha descrito que la inactivación de la Dab afecta a la migración y al correcto desarrollo dendrítico durante la neurogénesis en el GD adulto (Teixeira et al. 2012). Por ello, analizamos si los animales KO para *Igf-I* poseían alteraciones en la vía de señalización de la relina mediante inmunotinción con anticuerpos contra P-Dab1. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el marcaje con P-Dab1 entre los ratones KO para *Igf-I* y los controles, lo que indica, de manera preliminar, que IGF-I podría no activar esa vía en el GD.

Las alteraciones en la maduración y posicionamiento que presenta el ratón KO para *Igf-I*, y fenotipo observado en la vía de PI3K, se asemeja al descrito en el HP de ratones con fallos cognitivos, asociados a la alteración de la maduración de células grano y al posicionamiento ectópico en la CCG

(Kim et al. 2009; Amiri et al. 2012; Pun et al. 2012; Salih et al. 2012). Además, se ha relacionado la bajada de los niveles de IGF-I al déficit cognitivo que se produce con la edad (Muller et al. 2012). Por tanto, la falta de IGF-I podría ser uno de los componentes responsables de la alteración en la maduración neuronal observado en algunos desórdenes neurológicos.

4.6. Generación de la línea de ratones Nestina-Cre:*Igf-I*

La escasa supervivencia postnatal de los ratones KO globales para IGF-I (Liu et al. 1993; Pichel et al. 2003; Hurtado-Chong et al. 2009), nos llevó a generar un ratón condicional que careciera de *Igf-I* sólo en el SN, que además nos permitiría estudiar el papel del *Igf-I* producido localmente durante la neurogénesis hipocampal adulta. De esta manera, no estaríamos limitados por la falta de animales postnatales-adultos y podríamos realizar estudios de comportamiento, rescate del fenotipo *in vivo*, entre otros, los cuales no han sido imposibles con la línea KO global. La estrategia elegida para ello se basó en el uso de la enzima Cre recombinasa que se caracteriza por reconocer unas secuencias específicas del ADN denominadas loxP, por donde la enzima cortará el ADN y unirá los fragmentos resultantes (Kos 2004). Para que la expresión de la Cre fuera específica del SN se utilizó la línea Nestina-Cre, la cual posee el gen de la Cre bajo el promotor y un potenciador específico del SN del gen de la Nestina (ver Material y Métodos) (Zimmerman et al. 1994; Josephson et al. 1998; Tronche et al. 1999; Panchision et al. 2001). Posteriormente, se cruzaron ratones Nestina-Cre con ratones *Igf-I* loxP, que poseían las secuencias loxP flanqueando al exón 4 del gen de *Igf-I* (Liu et al. 1998), de manera que cuando se expresase la Cre se eliminaría una parte del gen *Igf-I*, dando lugar a una proteína no funcional.

Nuestros controles previos muestran que ni la expresión de la enzima Cre ni la inserción de las secuencias loxP en el gen del *Igf-I*, producen alteraciones durante el desarrollo de los ratones, no encontrándose diferencias a nivel corporal ni alteraciones estructurales en el cerebro. Además, el cruce de la línea Nestina-Cre con la línea reportera ROSA26-YFP (Srinivas et al. 2001), mostraba que la expresión de la YFP era aparentemente específica del SN, tanto en embriones como en ratones adultos. Recientemente, se ha publicado que en la línea Nestin-Cre la recombinación no se produce en los estadios iniciales del desarrollo de los progenitores neurales, sino que sólo se detecta expresión de Cre en zonas que contienen neuronas postmitóticas (Liang et al. 2012). Sin embargo, nuestro análisis de embriones E12,5 demuestra una alta expresión de la YFP en todo el neuroepitelio. Por otro lado, la expresión de la YFP detectada en el SN de los animales adultos Cre⁺ fue más baja que en embriones, posiblemente debido a un silenciamiento de la expresión de la YFP por mecanismos epigenéticos (Long y Rossi 2009). En el resto de tejidos no nerviosos se encontró una expresión de la YFP muy baja, probablemente debida a la presencia de nervios en esos tejidos. Contrariamente, cuando analizamos los niveles de *Igf-I* en tejidos de los animales *Igf-I*^{Δ/Δ}, se observó que el tejido nervioso y otros como el hígado, el pulmón o el corazón presentaban una reducción en los niveles de expresión de *Igf-I* comparado con los mismos tejidos de los ratones control aunque la disminución de *Igf-I* en el cerebro fue de 2-4 veces mayor que en el resto de tejidos. Para descartar que esta disminución en los niveles de *Igf-I* se debiese a los nervios presentes en los tejidos, se cultivaron CMHP, fibroblastos y células de hígado para analizar los niveles de *Igf-I* en una población celular más homogénea que en el tejido completo. En las CMHP obtenidas de los ratones *Igf-I*^{Δ/Δ} no

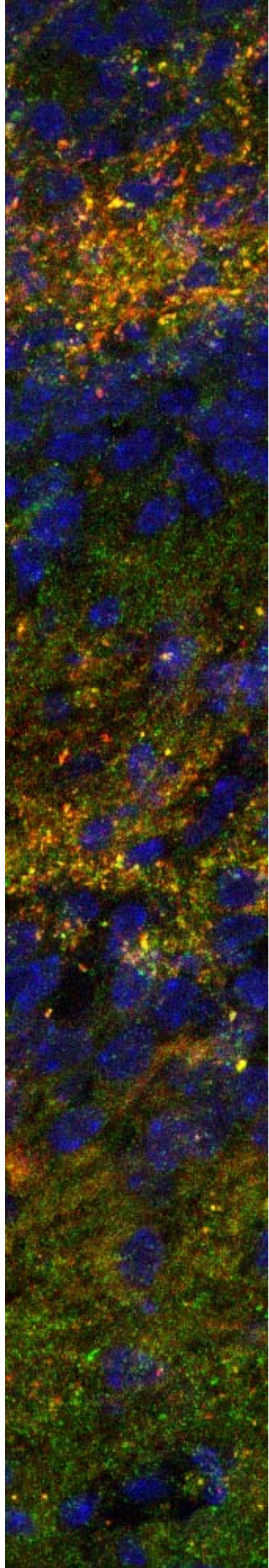
se detectó expresión de *Igf-I*, lo que demostraba que la enzima Cre había delecionado el gen de *Igf-I* en el SN. Sin embargo, en el resto de cultivos de células aisladas de ratones *Igf-I^{Δ/Δ}* también se observó una reducción de los niveles de *Igf-I* (aunque no total), lo que parecía indicar, de forma preliminar (debido al reducido número de animales analizados), que la enzima Cre había actuado también en tejidos no nerviosos cortando el gen de *Igf-I* como se confirmó por PCR posteriormente. Esta deleción de *Igf-I* en tejidos no nerviosos parecía no haberse producido en estadios tempranos del desarrollo embrionario, ya que los ratones *Igf-I^{Δ/Δ}*, no presentaron un fenotipo similar al descrito para los ratones KO globales (Baker et al. 1993; Liu et al. 1993). De hecho, los ratones *Igf-I^{Δ/Δ}* eran capaces de sobrevivir postnatalmente y alcanzar la vida adulta siendo fértiles, aunque poseían un peso corporal ligeramente inferior al de sus hermanos control. Sin embargo, el momento en el que se produce la deleción del gen de *Igf-I* en los tejidos no nerviosos aún está por determinar. Adicionalmente a la determinación de los niveles de expresión de *Igf-I*, se evaluará los niveles séricos y cerebrales de IGF-I mediante ELISA para caracterizar completamente los ratones Nestina-Cre:*Igf-I* (Trejo et al. 2007; Cao et al. 2013).

Desde la generación de la línea Nestina-Cre, ésta ha sido utilizada en múltiples estudios para la eliminación de distintos genes de forma específica en el SN. En algunos de estos estudios confirman la especificidad de la enzima Cre solamente mediante el uso de líneas reporteras, similares a la descrita en esta tesis, y/o confirman la deleción del gen de interés en el SN sin comprobar los niveles de expresión en el resto de tejidos (Liu et al. 2009; Matsumoto et al. 2011; Braun et al. 2012; Katz et al. 2012; Byerly et al. 2013). Sólo en algunos estudios muestran que la enzima Cre no actuó en tejidos no nerviosos (Asai et al. 2012; Ohlsson et al. 2012). Sin embargo, en algunos trabajos se ha demostrado que la enzima Cre puede expresarse independientemente del promotor que la regula, produciéndose deleción de manera ectópica (Eckardt et al. 2004; Zhang et al. 2007). Estos resultados, junto con los expuestos en esta tesis, ponen de manifiesto la importancia de caracterizar completamente las líneas de ratones KO condicionales para evitar malinterpretaciones de los datos obtenidos en los distintos estudios.

A pesar de que la deleción en el gen del *Igf-I* no fuera totalmente específica del SN, nuestros resultados preliminares muestran un fenotipo, en parte similar, en el GD de los animales *Igf-I^{Δ/Δ}* al descrito para el ratón KO global. Los ratones *Igf-I^{Δ/Δ}* de las dos camadas analizadas, poseen una reducción en el área de la CCG, con un acúmulo de progenitores neuronales *Tbr2⁺* y una menor complejidad morfológica de las células *DCX⁺*. Además, en una de las camadas, los ratones *Igf-I^{Δ/Δ}* tienen una acumulación de células *Ki67⁺* y una desorganización de las células *Prox1⁺* (dato no mostrado). De confirmarse estos resultados, demostrarían que el efecto que produce la falta de IGF-I durante la neurogénesis hipocampal es específico de IGF-I y no secundario a un menor desarrollo somático, ya que los ratones *Igf-I^{Δ/Δ}* no poseen alteraciones de crecimiento comparables a las del ratón global.

En conjunto, nuestros resultados muestran que IGF-I es necesario para el mantenimiento de la población de CMN y progenitores neuronales en el GD postnatal y adulto y para el correcto posicionamiento y maduración morfológica de las neuronas grano del GD del HP (Fig.88).

Conclusiones



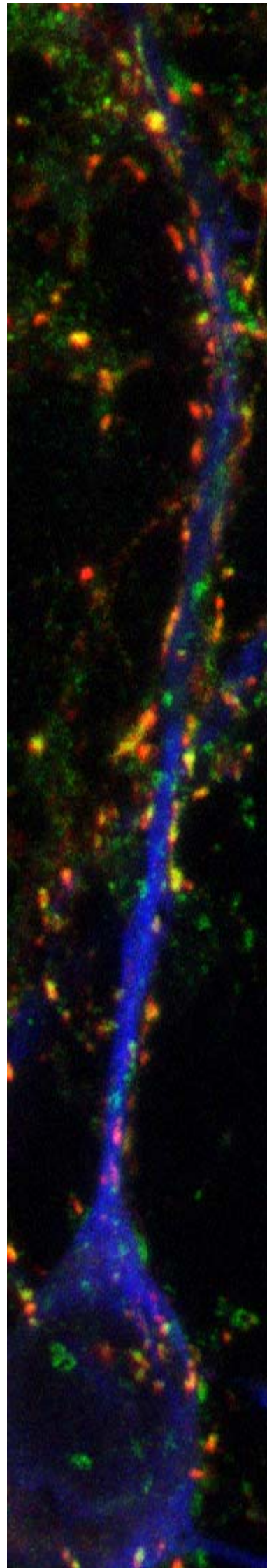
De los resultados expuestos en este trabajo, queremos destacar las siguientes conclusiones:

1. Los factores de crecimiento FGF-2 y EGF son críticos para el mantenimiento de la supervivencia y el estado indiferenciado de las CMBO en cultivo, especialmente de las células de origen adulto, ya que el ayuno parcial de los mismos induce muerte y diferenciación celular a través de cambios en la expresión de genes como *Dscaml1*, *Cryab*, *Pla2g7*, *Gpr17* y *Ndr2*.
2. La neurotrofina BDNF promueve la maduración morfológica de neuronas GABAérgicas y, en menor medida, dopaminérgicas derivadas de CMBOe, regulando, primero, el crecimiento de un mayor número de neuritas y, a continuación, favoreciendo la eliminación de algunas de ellas y el crecimiento de otras. Además, BDNF estimula la formación de sinapsis en neuronas derivadas de CMBOe, incrementando el número y el tamaño de los botones sinápticos.
3. El factor de crecimiento IGF-I podría regular la eliminación de sinapsis en el BO y en el HP durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, IGF-I promueve la maduración morfológica, y posiblemente sináptica, de las neuronas grano en el GD adulto, lo que indicaría un papel dual de este factor durante el establecimiento y maduración de sinapsis.
4. El IGF-I parece ser necesario para la correcta generación de progenitores a partir de CMNs, ya que su ausencia produce una acumulación de dichos progenitores en posiciones aberrantes.
5. El factor IGF-I regula la migración y diferenciación de las neuronas grano del giro dentado del hipocampo, afectando a su morfología y a su correcto posicionamiento.
6. La ausencia de IGF-I no produce cambios generales en la fosforilación de Akt^{Ser} en el HP, mientras que podría aumentar los niveles de P-CREB en las neuronas grano del GD, lo que sugiere la existencia de alteración en las vías de señalización bioquímica muy localizadas en dichas neuronas o una activación de CREB a través de vías distintas a la de PI3K/Akt.

Conclusión final:

Nuestros resultados destacan la importancia de los factores extracelulares que activan receptores tirosina quinasa en la neurogénesis embrionaria y adulta, regulando la proliferación y mantenimiento de la población de células madre neurales y progenitores, así como la diferenciación y maduración, tanto morfológica como sináptica, de los distintos tipos neuronales. Hemos puesto de manifiesto nuevas moléculas asociadas a los mecanismos de acción de FGF-2 y EGF, y se ha establecido un papel fundamental de IGF-I como regulador de la neurogénesis hipocampal adulta.

Bibliografía



- Aberg, M. A., N. D. Aberg, H. Hedbacker, J. Oscarsson y P. S. Eriksson (2000). "Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus." *J Neurosci* **20**(8): 2896-2903.
- Aberg, M. A., N. D. Aberg, T. D. Palmer, A. M. Alborn, C. Carlsson-Skewir, P. Bang, L. E. Rosengren, T. Olsson, F. H. Gage y P. S. Eriksson (2003). "IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells." *Mol Cell Neurosci* **24**(1): 23-40.
- Aburto, M. R., M. Magarinos, Y. Leon, I. Varela-Nieto y H. Sanchez-Calderon (2012). "AKT signaling mediates IGF-I survival actions on otic neural progenitors." *PLoS One* **7**(1): e30790.
- Agarwala, K. L., S. Ganesh, Y. Tsutsumi, T. Suzuki, K. Amano y K. Yamakawa (2001). "Cloning and functional characterization of DSCAML1, a novel DSCAM-like cell adhesion molecule that mediates homophilic intercellular adhesion." *Biochem Biophys Res Commun* **285**(3): 760-772.
- Aguirre, A. y V. Gallo (2007). "Reduced EGFR signaling in progenitor cells of the adult subventricular zone attenuates oligodendrogenesis after demyelination." *Neuron Glia Biol* **3**(3): 209-220.
- Ahmed, S., B. A. Reynolds y S. Weiss (1995). "BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors." *J Neurosci* **15**(8): 5765-5778.
- Aimone, J. B., W. Deng y F. H. Gage (2011). "Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation." *Neuron* **70**(4): 589-596.
- Alonso, M., G. Lepousez, W. Sebastien, C. Bardy, M. M. Gabelle, N. Torquet y P. M. Lledo (2012). "Activation of adult-born neurons facilitates learning and memory." *Nat Neurosci* **15**(6): 897-904.
- Alsina, B., T. Vu y S. Cohen-Cory (2001). "Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: dynamics and modulation by BDNF." *Nat Neurosci* **4**(11): 1093-1101.
- Altman, J. y S. A. Bayer (1990a). "Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods." *J Comp Neurol* **301**(3): 365-381.
- Altman, J. y S. A. Bayer (1990b). "Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells." *J Comp Neurol* **301**(3): 325-342.
- Altman, J. y G. D. Das (1965). "Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats." *J Comp Neurol* **124**(3): 319-335.
- Alvarez-Buylla, A. y J. M. Garcia-Verdugo (2002). "Neurogenesis in adult subventricular zone." *J Neurosci* **22**(3): 629-634.
- Alvarez-Buylla, A. y C. Lois (1995). "Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates." *Stem Cells* **13**(3): 263-272.
- Allen, Z. J., 2nd, R. R. Waclaw, M. C. Colbert y K. Campbell (2007). "Molecular identity of olfactory bulb interneurons: transcriptional codes of periglomerular neuron subtypes." *J Mol Histol* **38**(6): 517-525.
- Amiri, A., W. Cho, J. Zhou, S. G. Birnbaum, C. M. Sinton, R. M. McKay y L. F. Parada (2012). "Pten deletion in adult hippocampal neural stem/progenitor cells causes cellular abnormalities and alters neurogenesis." *J Neurosci* **32**(17): 5880-5890.
- Andersson, O., A. Stenqvist, A. Attersand y G. von Euler (2001). "Nucleotide sequence, genomic organization, and chromosomal localization of genes encoding the human NMDA receptor subunits NR3A and NR3B." *Genomics* **78**(3): 178-184.
- Annunziata, M., R. Granata y E. Ghigo (2011). "The IGF system." *Acta Diabetol* **48**(1): 1-9.
- Anthony, T. E., C. Klein, G. Fishell y N. Heintz (2004). "Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system." *Neuron* **41**(6): 881-890.
- Araki, W., H. Kume, A. Oda, A. Tamaoka y F. Kametani (2009). "IGF-1 promotes beta-amyloid production by a secretase-independent mechanism." *Biochem Biophys Res Commun* **380**(1): 111-114.

- Arsenijevic, Y., S. Weiss, B. Schneider y P. Aebischer (2001). "Insulin-like growth factor-I is necessary for neural stem cell proliferation and demonstrates distinct actions of epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2." *J Neurosci* **21**(18): 7194-7202.
- Asai, M., N. Asai, A. Murata, H. Yokota, K. Ohmori, S. Mii, A. Enomoto, Y. Murakumo y M. Takahashi (2012). "Similar phenotypes of Girdin germ-line and conditional knockout mice indicate a crucial role for Girdin in the nestin lineage." *Biochem Biophys Res Commun* **426**(4): 533-538.
- Ashburner, M., C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, M. A. Harris, D. P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J. C. Matese, J. E. Richardson, M. Ringwald, G. M. Rubin y G. Sherlock (2000). "Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium." *Nat Genet* **25**(1): 25-29.
- Bagley, J., G. LaRocca, D. A. Jimenez y N. N. Urban (2007). "Adult neurogenesis and specific replacement of interneuron subtypes in the mouse main olfactory bulb." *BMC Neurosci* **8**: 92.
- Bailey, M. S., A. C. Puche y M. T. Shipley (1999). "Development of the olfactory bulb: evidence for glia-neuron interactions in glomerular formation." *J Comp Neurol* **415**(4): 423-448.
- Baker, J., J. P. Liu, E. J. Robertson y A. Efstratiadis (1993). "Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth." *Cell* **75**(1): 73-82.
- Barde, Y. A., D. Edgar y H. Thoenen (1982). "Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain." *EMBO J* **1**(5): 549-553.
- Bartlett, W. P., X. S. Li y M. Williams (1992). "Expression of IGF-1 mRNA in the murine subventricular zone during postnatal development." *Brain Res Mol Brain Res* **12**(4): 285-291.
- Bartlett, W. P., X. S. Li, M. Williams y S. Benkovic (1991). "Localization of insulin-like growth factor-1 mRNA in murine central nervous system during postnatal development." *Dev Biol* **147**(1): 239-250.
- Bateman, J. M. y H. McNeill (2006). "Insulin/IGF signalling in neurogenesis." *Cell Mol Life Sci* **63**(15): 1701-1705.
- Bath, K. G., N. Mandairon, D. Jing, R. Rajagopal, R. Kapoor, Z. Y. Chen, T. Khan, C. C. Proenca, R. Kraemer, T. A. Cleland, B. L. Hempstead, M. V. Chao y F. S. Lee (2008). "Variant brain-derived neurotrophic factor (Val66Met) alters adult olfactory bulb neurogenesis and spontaneous olfactory discrimination." *J Neurosci* **28**(10): 2383-2393.
- Beck, K. D., L. Powell-Braxton, H. R. Widmer, J. Valverde y F. Hefti (1995). "Igf1 gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons." *Neuron* **14**(4): 717-730.
- Beckervordersandforth, R., P. Tripathi, J. Ninkovic, E. Bayam, A. Lepier, B. Stempfhuber, F. Kirchhoff, J. Hirrlinger, A. Haslinger, D. C. Lie, J. Beckers, B. Yoder, M. Irmeler y M. Götz (2010). "In vivo fate mapping and expression analysis reveals molecular hallmarks of prospectively isolated adult neural stem cells." *Cell Stem Cell* **7**(6): 744-758.
- Bednarczyk, M. R., L. C. Hacker, S. Fortin-Nunez, A. Aumont, R. Bergeron y K. J. Fernandes (2011). "Distinct stages of adult hippocampal neurogenesis are regulated by running and the running environment." *Hippocampus* **21**(12): 1334-1347.
- Benraiss, A., E. Chmielnicki, K. Lerner, D. Roh y S. A. Goldman (2001). "Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain." *J Neurosci* **21**(17): 6718-6731.
- Bergami, M., R. Rimondini, S. Santi, R. Blum, M. Gotz y M. Canossa (2008). "Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(40): 15570-15575.
- Berghuis, P., K. Agerman, M. B. Dobszay, L. Minichiello, T. Harkany y P. Ernfors (2006). "Brain-derived neurotrophic factor selectively regulates dendritogenesis of parvalbumin-containing interneurons in the main olfactory bulb through the PLCgamma pathway." *J Neurobiol* **66**(13): 1437-1451.
- Bergmann, O., J. Liebl, S. Bernard, K. Alkass, M. S. Yeung, P. Steier, W. Kutschera, L. Johnson, M. Landen, H. Druid, K. L. Spalding y J. Frisen (2012). "The age of olfactory bulb neurons in humans." *Neuron* **74**(4): 634-639.

- Bernal, G. M. y D. A. Peterson (2011). "Phenotypic and gene expression modification with normal brain aging in GFAP-positive astrocytes and neural stem cells." *Aging Cell* **10**(3): 466-482.
- Blanchart, A., J. A. De Carlos y L. Lopez-Mascaraque (2006). "Time frame of mitral cell development in the mice olfactory bulb." *J Comp Neurol* **496**(4): 529-543.
- Blanchart, A., M. Romaguera, J. M. Garcia-Verdugo, J. A. de Carlos y L. Lopez-Mascaraque (2008). "Synaptogenesis in the mouse olfactory bulb during glomerulus development." *Eur J Neurosci* **27**(11): 2838-2846.
- Bollag, R. J., Z. Siegfried, J. A. Cebra-Thomas, N. Garvey, E. M. Davison y L. M. Silver (1994). "An ancient family of embryonically expressed mouse genes sharing a conserved protein motif with the T locus." *Nat Genet* **7**(3): 383-389.
- Bonaguidi, M. A., M. A. Wheeler, J. S. Shapiro, R. P. Stadel, G. J. Sun, G. L. Ming y H. Song (2011). "In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics." *Cell* **145**(7): 1142-1155.
- Bondy, C. A. y C. M. Cheng (2004). "Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain." *Eur J Pharmacol* **490**(1-3): 25-31.
- Bondy, C. A., H. Werner, C. T. Roberts, Jr. y D. LeRoith (1990). "Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and type I IGF receptor gene expression in early organogenesis: comparison with IGF-II gene expression." *Mol Endocrinol* **4**(9): 1386-1398.
- Bonni, A., A. Brunet, A. E. West, S. R. Datta, M. A. Takasu y M. E. Greenberg (1999). "Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms." *Science* **286**(5443): 1358-1362.
- Bousette, N., S. Chugh, V. Fong, R. Isserlin, K.-H. Kim, A. Volchuk, P. H. Backx, P. Liu, T. Kislinger, D. H. MacLennan, A. Emili y A. O. Gramolini (2010). "Constitutively active calcineurin induces cardiac endoplasmic reticulum stress and protects against apoptosis that is mediated by alpha-crystallin-B." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(43): 18481-18486.
- Braun, T. P., A. J. Grossberg, B. O. Veleza-Rotse, J. E. Maxson, M. Szumowski, A. P. Barnes y D. L. Marks (2012). "Expression of myeloid differentiation factor 88 in neurons is not requisite for the induction of sickness behavior by interleukin-1beta." *J Neuroinflammation* **9**: 229.
- Brill, M. S., J. Ninkovic, E. Winpenny, R. D. Hodge, I. Ozen, R. Yang, A. Lepier, S. Gascon, F. Erdelyi, G. Szabo, C. Parras, F. Guillemot, M. Frotscher, B. Berninger, R. F. Hevner, O. Raineteau y M. Gotz (2009). "Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons." *Nat Neurosci* **12**(12): 1524-1533.
- Brill, M. S., M. Snapyan, H. Wohlfrom, J. Ninkovic, M. Jawerka, G. S. Mastick, R. Ashery-Padan, A. Saghatelian, B. Berninger y M. Gotz (2008). "A *dlx2*- and *pax6*-dependent transcriptional code for periglomerular neuron specification in the adult olfactory bulb." *J Neurosci* **28**(25): 6439-6452.
- Brunet, A., S. R. Datta y M. E. Greenberg (2001). "Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway." *Curr Opin Neurobiol* **11**(3): 297-305.
- Byerly, M. S., M. Al Salayta, R. D. Swanson, K. Kwon, J. M. Peterson, Z. Wei, S. Aja, T. H. Moran, S. Blackshaw y G. W. Wong (2013). "Estrogen-related receptor beta deletion modulates whole-body energy balance via estrogen-related receptor gamma and attenuates neuropeptide Y gene expression." *Eur J Neurosci*.
- Camarero, G., C. Avendano, C. Fernandez-Moreno, A. Villar, J. Contreras, F. de Pablo, J. G. Pichel y I. Varela-Nieto (2001). "Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal *Igf-1*-deficient mice." *J Neurosci* **21**(19): 7630-7641.
- Cameron, H. A., C. S. Woolley, B. S. McEwen y E. Gould (1993). "Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat." *Neuroscience* **56**(2): 337-344.
- Cao, L., A. Dhillia, J. Mukai, R. Blazeski, C. Lodovichi, C. A. Mason y J. A. Gogos (2007). "Genetic modulation of BDNF signaling affects the outcome of axonal competition in vivo." *Curr Biol* **17**(11): 911-921.
- Cao, P., A. Maximov y T. C. Sudhof (2011). "Activity-dependent IGF-1 exocytosis is controlled by the Ca^{2+} -sensor synaptotagmin-10." *Cell* **145**(2): 300-311.

- Cao, P., X. Yang y T. C. Sudhof (2013). "Complexin activates exocytosis of distinct secretory vesicles controlled by different synaptotagmins." *J Neurosci* **33**(4): 1714-1727.
- Carro, E., J. L. Trejo, T. Gomez-Isla, D. LeRoith y I. Torres-Aleman (2002). "Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels." *Nat Med* **8**(12): 1390-1397.
- Cattaneo, E. y R. McKay (1990). "Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor." *Nature* **347**(6295): 762-765.
- Ceccatelli, S., P. Ernfors, M. J. Villar, H. Persson y T. Hokfelt (1991). "Expanded distribution of mRNA for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the rat brain after colchicine treatment." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(22): 10352-10356.
- Ceruti, S., F. Viganò, E. Boda, S. Ferrario, G. Magni, M. Boccazzi, P. Rosa, A. Buffo y M. P. Abbracchio (2011). "Expression of the new P2Y-like receptor GPR17 during oligodendrocyte precursor cell maturation regulates sensitivity to ATP-induced death." *Glia* **59**(3): 363-378.
- Ciccolini, F. y C. N. Svendsen (1998). "Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) promotes acquisition of epidermal growth factor (EGF) responsiveness in mouse striatal precursor cells: identification of neural precursors responding to both EGF and FGF-2." *J Neurosci* **18**(19): 7869-7880.
- Cohen-Cory, S. y S. E. Fraser (1995). "Effects of brain-derived neurotrophic factor on optic axon branching and remodelling in vivo." *Nature* **378**(6553): 192-196.
- Coles-Takabe, B. L., I. Brain, K. A. Purpura, P. Karpowicz, P. W. Zandstra, C. M. Morshead y D. van der Kooy (2008). "Don't look: growing clonal versus nonclonal neural stem cell colonies." *Stem Cells* **26**(11): 2938-2944.
- Collin, C., C. Vicario-Abejon, M. E. Rubio, R. J. Wenthold, R. D. McKay y M. Segal (2001). "Neurotrophins act at presynaptic terminals to activate synapses among cultured hippocampal neurons." *Eur J Neurosci* **13**(7): 1273-1282.
- Conner, J. M., J. C. Lauterborn, Q. Yan, C. M. Gall y S. Varon (1997). "Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport." *J Neurosci* **17**(7): 2295-2313.
- Coras, R., F. A. Siebzehnrbuhl, E. Pauli, H. B. Huttner, M. Njunting, K. Kobow, C. Villmann, E. Hahnen, W. Neuhuber, D. Weigel, M. Buchfelder, H. Stefan, H. Beck, D. A. Steindler y I. Blümcke (2010). "Low proliferation and differentiation capacities of adult hippocampal stem cells correlate with memory dysfunction in humans." *Brain* **133**(11): 3359-3372.
- Corvin, A. P., I. Molinos, G. Little, G. Donohoe, M. Gill, D. W. Morris y D. Tropea (2012). "Insulin-like growth factor 1 (IGF1) and its active peptide (1-3)IGF1 enhance the expression of synaptic markers in neuronal circuits through different cellular mechanisms." *Neurosci Lett* **520**(1): 51-56.
- Craig, C. G., V. Tropepe, C. M. Morshead, B. A. Reynolds, S. Weiss y D. van der Kooy (1996). "In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain." *J Neurosci* **16**(8): 2649-2658.
- Croci, L., V. Barili, D. Chia, L. Massimino, R. van Vugt, G. Masserdotti, R. Longhi, P. Rotwein y G. G. Consalez (2010). "Local insulin-like growth factor I expression is essential for Purkinje neuron survival at birth." *Cell Death Differ*.
- Curtis, M. A., M. Kam, U. Nannmark, M. F. Anderson, M. Z. Axell, C. Wikkelsø, S. Holtas, W. M. van Roon-Mom, T. Bjork-Eriksson, C. Nordborg, J. Frisen, M. Dragunow, R. L. Faull y P. S. Eriksson (2007). "Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension." *Science* **315**(5816): 1243-1249.
- Chamero, P., T. Leinders-Zufall y F. Zufall (2012). "From genes to social communication: molecular sensing by the vomeronasal organ." *Trends Neurosci* **35**(10): 597-606.
- Chao, M. V. (2003). "Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways." *Nat Rev Neurosci* **4**(4): 299-309.
- Chen, R., L. Yang y T. M. McIntyre (2007). "Cytotoxic phospholipid oxidation products. Cell death from mitochondrial damage and the intrinsic caspase cascade." *J Biol Chem* **282**(34): 24842-24850.

- Chen, Y., H. Wu, S. Wang, H. Koito, J. Li, F. Ye, J. Hoang, S. S. Escobar, A. Gow, H. A. Arnett, B. D. Trapp, N. J. Karandikar, J. Hsieh y Q. R. Lu (2009). "The oligodendrocyte-specific G protein-coupled receptor GPR17 is a cell-intrinsic timer of myelination." Nat Neurosci **12**(11): 1398-1406.
- Cheng, C. M., M. Cohen, V. Tseng y C. A. Bondy (2001). "Endogenous IGF1 enhances cell survival in the postnatal dentate gyrus." J Neurosci Res **64**(4): 341-347.
- Cheng, C. M., R. F. Mervis, S. L. Niu, N. Salem, Jr., L. A. Witters, V. Tseng, R. Reinhardt y C. A. Bondy (2003). "Insulin-like growth factor 1 is essential for normal dendritic growth." J Neurosci Res **73**(1): 1-9.
- Cheng, P. L., A. H. Song, Y. H. Wong, S. Wang, X. Zhang y M. M. Poo (2011). "Self-amplifying autocrine actions of BDNF in axon development." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(45): 18430-18435.
- Cheng, Y., I. B. Black y E. DiCicco-Bloom (2002). "Hippocampal granule neuron production and population size are regulated by levels of bFGF." Eur J Neurosci **15**(1): 3-12.
- Chiamarello, S., G. Dalmasso, L. Bezin, D. Marcel, F. Jourdan, P. Peretto, A. Fasolo y S. De Marchis (2007). "BDNF/ TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways." Eur J Neurosci **26**(7): 1780-1790.
- Choi, J., J. Ko, B. Racz, A. Burette, J. R. Lee, S. Kim, M. Na, H. W. Lee, K. Kim, R. J. Weinberg y E. Kim (2005). "Regulation of dendritic spine morphogenesis by insulin receptor substrate 53, a downstream effector of Rac1 and Cdc42 small GTPases." J Neurosci **25**(4): 869-879.
- Deckner, M. L., J. Frisen, V. M. Verge, T. Hokfelt y M. Risling (1993). "Localization of neurotrophin receptors in olfactory epithelium and bulb." Neuroreport **5**(3): 301-304.
- Demos, C., M. Bandyopadhyay y B. Rohrer (2008). "Identification of candidate genes for human retinal degeneration loci using differentially expressed genes from mouse photoreceptor dystrophy models." Mol Vis **14**: 1639-1649.
- Díaz-Guerra, E., J. Pignatelli, V. Nieto-Estévez y C. Vicario-Abejón (2013). "Transcriptional regulation of olfactory bulb neurogenesis." Anatomical Record.
- Díaz, B., J. Serna, F. De Pablo y E. J. de la Rosa (2000). "In vivo regulation of cell death by embryonic (pro)insulin and the insulin receptor during early retinal neurogenesis." Development **127**(8): 1641-1649.
- Dietrich, P., I. Dragatsis, S. Xuan, S. Zeitlin y A. Efstratiadis (2000). "Conditional mutagenesis in mice with heat shock promoter-driven cre transgenes." Mamm Genome **11**(3): 196-205.
- Doetsch, F., I. Caillé, D. A. Lim, J. M. García-Verdugo y A. Alvarez-Buylla (1999). "Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain." Cell **97**(6): 703-716.
- Doetsch, F., L. Petreanu, I. Caille, J. M. Garcia-Verdugo y A. Alvarez-Buylla (2002). "EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells." Neuron **36**(6): 1021-1034.
- Doncel-Pérez, E., S. Caballero-Chacón y M. Nieto-Sampedro (2009). "Neurosphere cell differentiation to aldynoglia promoted by olfactory ensheathing cell conditioned medium." Glia **57**(13): 1393-1409.
- Dorey, K. y E. Amaya (2010). "FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis." Development **137**(22): 3731-3742.
- Dranovsky, A., A. M. Picchini, T. Moadel, A. C. Sisti, A. Yamada, S. Kimura, E. D. Leonardo y R. Hen (2011). "Experience dictates stem cell fate in the adult hippocampus." Neuron **70**(5): 908-923.
- Duan, X., E. Kang, C. Y. Liu, G.-L. Ming y H. Song (2008). "Development of neural stem cell in the adult brain." Curr Opin Neurobiol **18**(1): 108-115.
- Eckardt, D., M. Theis, B. Doring, D. Speidel, K. Willecke y T. Ott (2004). "Spontaneous ectopic recombination in cell-type-specific Cre mice removes loxP-flanked marker cassettes in vivo." Genesis **38**(4): 159-165.

- Egawa, E. Y., K. Kato, M. Hiraoka, T. Nakaji-Hirabayashi y H. Iwata (2011). "Enhanced proliferation of neural stem cells in a collagen hydrogel incorporating engineered epidermal growth factor." Biomaterials **32**(21): 4737-4743.
- Ehm, O., C. Göritz, M. Covic, I. Schäffner, T. J. Schwarz, E. Karaca, B. Kempkes, E. Kremmer, F. W. Pfrieger, L. Espinosa, A. Bigas, C. Giachino, V. Taylor, J. Frisén y D. C. Lie (2010). "RBPJkappa-dependent signaling is essential for long-term maintenance of neural stem cells in the adult hippocampus." J Neurosci **30**(41): 13794-13807.
- Eiselleova, L., K. Matulka, V. Kriz, M. Kunova, Z. Schmidtova, J. Neradil, B. Tichy, D. Dvorakova, S. Pospisilova, A. Hampl y P. Dvorak (2009). "A complex role for FGF-2 in self-renewal, survival, and adhesion of human embryonic stem cells." Stem Cells **27**(8): 1847-1857.
- Encinas, J. M., T. V. Michurina, N. Peunova, J. H. Park, J. Tordo, D. A. Peterson, G. Fishell, A. Koulakov y G. Enikolopov (2011). "Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus." Cell Stem Cell **8**(5): 566-579.
- Enomoto, A., N. Asai, T. Namba, Y. Wang, T. Kato, M. Tanaka, H. Tatsumi, S. Taya, D. Tsuboi, K. Kuroda, N. Kaneko, K. Sawamoto, R. Miyamoto, M. Jijiwa, Y. Murakumo, M. Sokabe, T. Seki, K. Kaibuchi y M. Takahashi (2009). "Roles of disrupted-in-schizophrenia 1-interacting protein girdin in postnatal development of the dentate gyrus." Neuron **63**(6): 774-787.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, T. Björk-Eriksson, A. M. Alborn, C. Nordborg, D. A. Peterson y F. H. Gage (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." Nat Med **4**(11): 1313-1317.
- Ernfors, P., P. Lönnerberg, C. Ayer-LeLievre y H. Persson (1990a). "Developmental and regional expression of basic fibroblast growth factor mRNA in the rat central nervous system." J Neurosci Res **27**(1): 10-15.
- Ernfors, P., C. Wetmore, L. Olson y H. Persson (1990b). "Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family." Neuron **5**(4): 511-526.
- Evans, S. J., P. V. Choudary, C. R. Neal, J. Z. Li, M. P. Vawter, H. Tomita, J. F. Lopez, R. C. Thompson, F. Meng, J. D. Stead, D. M. Walsh, R. M. Myers, W. E. Bunney, S. J. Watson, E. G. Jones y H. Akil (2004). "Dysregulation of the fibroblast growth factor system in major depression." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(43): 15506-15511.
- Faigle, R. y H. Song (2012). "Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis." Biochim Biophys Acta.
- Fernandez, A. M. y I. Torres-Aleman (2012). "The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain." Nat Rev Neurosci **13**(4): 225-239.
- Ferron, S. R., N. Pozo, A. Laguna, S. Aranda, E. Porlan, M. Moreno, C. Fillat, S. de la Luna, P. Sanchez, M. L. Arbones y I. Farinas (2010). "Regulated segregation of kinase Dyrk1A during asymmetric neural stem cell division is critical for EGFR-mediated biased signaling." Cell Stem Cell **7**(3): 367-379.
- Fuentealba, L. C., K. Obernier y A. Alvarez-Buylla (2012). "Adult neural stem cells bridge their niche." Cell Stem Cell **10**(6): 698-708.
- Fuerst, P. G. y R. W. Burgess (2009). "Adhesion molecules in establishing retinal circuitry." Curr Opin Neurobiol **19**(4): 389-394.
- Gage, F. H. (2000). "Mammalian neural stem cells." Science **287**(5457): 1433-1438.
- Gago, N., V. Avellana-Adalid, A. B. Evercooren y M. Schumacher (2003). "Control of cell survival and proliferation of postnatal PSA-NCAM(+) progenitors." Mol Cell Neurosci **22**(2): 162-178.
- Galderisi, U., G. Peluso, G. Di Bernardo, A. Calarco, M. D'Apolito, O. Petillo, M. Cipollaro, F. R. Fusco y M. A. Melone (2013). "Efficient cultivation of neural stem cells with controlled delivery of FGF-2." Stem Cell Res **10**(1): 85-94.
- Galeeva, A., E. Treuter, S. Tomarev y M. Pelto-Huikko (2007). "A prospero-related homeobox gene Prox-1 is expressed during postnatal brain development as well as in the adult rodent brain." Neuroscience **146**(2): 604-616.

- Galichet, C., F. Guillemot y C. M. Parras (2008). "Neurogenin 2 has an essential role in development of the dentate gyrus." Development **135**(11): 2031-2041.
- Galvão, R. P., J. M. Garcia-Verdugo y A. Alvarez-Buylla (2008). "Brain-derived neurotrophic factor signaling does not stimulate subventricular zone neurogenesis in adult mice and rats." J Neurosci **28**(50): 13368-13383.
- Gao, J., C. Zhang, B. Yang, L. Sun, M. Westerfield y G. Peng (2012). "Dcc regulates asymmetric outgrowth of forebrain neurons in zebrafish." PLoS One **7**(5): e36516.
- Gao, W. Q., N. Shinsky, G. Ingle, K. Beck, K. A. Elias y L. Powell-Braxton (1999). "IGF-I deficient mice show reduced peripheral nerve conduction velocities and decreased axonal diameters and respond to exogenous IGF-I treatment." J Neurobiol **39**(1): 142-152.
- Gheusi, G., H. Cremer, H. McLean, G. Chazal, J. D. Vincent y P. M. Lledo (2000). "Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1823-1828.
- Giachino, C. y V. Taylor (2009). "Lineage analysis of quiescent regenerative stem cells in the adult brain by genetic labelling reveals spatially restricted neurogenic niches in the olfactory bulb." Eur J Neurosci **30**(1): 9-24.
- Glasper, E. R., M. V. Llorens-Martin, B. Leuner, E. Gould y J. L. Trejo (2010). "Blockade of insulin-like growth factor-I has complex effects on structural plasticity in the hippocampus." Hippocampus **20**(6): 706-712.
- Gleeson, J. G., P. T. Lin, L. A. Flanagan y C. A. Walsh (1999). "Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons." Neuron **23**(2): 257-271.
- Gonzalez-Perez, O. y A. Quinones-Hinojosa (2010). "Dose-dependent effect of EGF on migration and differentiation of adult subventricular zone astrocytes." Glia **58**(8): 975-983.
- Gonzalez-Perez, O., R. Romero-Rodriguez, M. Soriano-Navarro, J. M. Garcia-Verdugo y A. Alvarez-Buylla (2009). "Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular zone type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes." Stem Cells **27**(8): 2032-2043.
- Greber, B., P. Coulon, M. Zhang, S. Moritz, S. Frank, A. J. Muller-Molina, M. J. Arauzo-Bravo, D. W. Han, H. C. Pape y H. R. Scholer (2011). "FGF signalling inhibits neural induction in human embryonic stem cells." EMBO J **30**(24): 4874-4884.
- Gritti, A., P. Frölichsthal-Schoeller, R. Galli, E. A. Parati, L. Cova, S. F. Pagano, C. R. Bjornson y A. L. Vescovi (1999). "Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain." J Neurosci **19**(9): 3287-3297.
- Gritti, A., E. A. Parati, L. Cova, P. Frolichsthal, R. Galli, E. Wanke, L. Faravelli, D. J. Morassutti, F. Roisen, D. D. Nickel y A. L. Vescovi (1996). "Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor." J Neurosci **16**(3): 1091-1100.
- Guillemot, F. y C. Zimmer (2011). "From cradle to grave: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development." Neuron **71**(4): 574-588.
- Han, D. W., N. Tapia, A. Hermann, K. Hemmer, S. Hoing, M. J. Arauzo-Bravo, H. Zaehres, G. Wu, S. Frank, S. Moritz, B. Greber, J. H. Yang, H. T. Lee, J. C. Schwamborn, A. Storch y H. R. Scholer (2012). "Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors." Cell Stem Cell **10**(4): 465-472.
- Heinrich, C., S. Gascon, G. Masserdotti, A. Lepier, R. Sanchez, T. Simon-Ebert, T. Schroeder, M. Gotz y B. Berninger (2011). "Generation of subtype-specific neurons from postnatal astroglia of the mouse cerebral cortex." Nat Protoc **6**(2): 214-228.
- Hernandez-Sanchez, C., A. Lopez-Carranza, C. Alarcon, E. J. de La Rosa y F. de Pablo (1995). "Autocrine/paracrine role of insulin-related growth factors in neurogenesis: local expression and effects on cell proliferation and differentiation in retina." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9834-9838.
- Hinds, J. W. (1968a). "Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. I. Time of origin of neurons and neuroglia." J Comp Neurol **134**(3): 287-304.

- Hinds, J. W. (1968b). "Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. II. Cell proliferation and migration." *J Comp Neurol* **134**(3): 305-322.
- Hinds, J. W. (1972a). "Early neuron differentiation in the mouse of olfactory bulb. I. Light microscopy." *J Comp Neurol* **146**(2): 233-252.
- Hinds, J. W. (1972b). "Early neuron differentiation in the mouse olfactory bulb. II. Electron microscopy." *J Comp Neurol* **146**(2): 253-276.
- Hirabayashi, Y. y Y. Gotoh (2010). "Epigenetic control of neural precursor cell fate during development." *Nat Rev Neurosci* **11**(6): 377-388.
- Hodge, R. D., A. J. D'Ercole y J. R. O'Kusky (2004). "Insulin-like growth factor-I accelerates the cell cycle by decreasing G1 phase length and increases cell cycle reentry in the embryonic cerebral cortex." *J Neurosci* **24**(45): 10201-10210.
- Hodge, R. D., A. J. D'Ercole y J. R. O'Kusky (2007). "Insulin-like growth factor-I (IGF-I) inhibits neuronal apoptosis in the developing cerebral cortex in vivo." *Int J Dev Neurosci* **25**(4): 233-241.
- Hodge, R. D., A. J. Garcia, 3rd, G. E. Elsen, B. R. Nelson, K. E. Mussar, S. L. Reiner, J. M. Ramirez y R. F. Hevner (2013). "Tbr2 expression in cajal-retzius cells and intermediate neuronal progenitors is required for morphogenesis of the dentate gyrus." *J Neurosci* **33**(9): 4165-4180.
- Hodge, R. D., R. J. Kahoud y R. F. Hevner (2012). "Transcriptional control of glutamatergic differentiation during adult neurogenesis." *Cell Mol Life Sci*.
- Hodge, R. D., T. D. Kowalczyk, S. A. Wolf, J. M. Encinas, C. Rippey, G. Enikolopov, G. Kempermann y R. F. Hevner (2008). "Intermediate progenitors in adult hippocampal neurogenesis: Tbr2 expression and coordinate regulation of neuronal output." *J Neurosci* **28**(14): 3707-3717.
- Hofer, M., S. R. Pagliusi, A. Hohn, J. Leibrock y Y. A. Barde (1990). "Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain." *EMBO J* **9**(8): 2459-2464.
- Höglinger, G. U., P. Rizk, M. P. Muriel, C. Duyckaerts, W. H. Oertel, I. Caille y E. C. Hirsch (2004). "Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease." *Nat Neurosci* **7**(7): 726-735.
- Horch, H. W. y L. C. Katz (2002). "BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons." *Nat Neurosci* **5**(11): 1177-1184.
- Horch, H. W., A. Kruttgen, S. D. Portbury y L. C. Katz (1999). "Destabilization of cortical dendrites and spines by BDNF." *Neuron* **23**(2): 353-364.
- Hsieh, J. (2012). "Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis." *Genes Dev* **26**(10): 1010-1021.
- Hsieh, J., J. B. Aimone, B. K. Kaspar, T. Kuwabara, K. Nakashima y F. H. Gage (2004). "IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes." *J Cell Biol* **164**(1): 111-122.
- Hu, Q., S. Y. Lee, J. R. O'Kusky y P. Ye (2012). "Signaling Through the Type 1 Insulin-Like Growth Factor Receptor (IGF1R) Interacts with Canonical Wnt Signaling to Promote Neural Proliferation in Developing Brain." *ASN Neuro*.
- Hu, Q., L. Zhang, J. Wen, S. Wang, M. Li, R. Feng, X. Yang y L. Li (2010). "The EGF receptor-sox2-EGF receptor feedback loop positively regulates the self-renewal of neural precursor cells." *Stem Cells* **28**(2): 279-286.
- Hurtado-Chong, A., M. J. Yusta-Boyo, E. Vergaño-Vera, A. Bulfone, F. de Pablo y C. Vicario-Abejón (2009). "IGF-I promotes neuronal migration and positioning in the olfactory bulb and the exit of neuroblasts from the subventricular zone." *Eur J Neurosci* **30**(5): 742-755.
- Iguchi, H., T. Mitsui, M. Ishida, S. Kanba y J. Arita (2011). "cAMP response element-binding protein (CREB) is required for epidermal growth factor (EGF)-induced cell proliferation and serum response element activation in neural stem cells isolated from the forebrain subventricular zone of adult mice." *Endocr J* **58**(9): 747-759.

- Imamura, F. y C. A. Greer (2009). "Dendritic branching of olfactory bulb mitral and tufted cells: regulation by TrkB." *PLoS One* **4**(8): e6729.
- Irizarry, R. A., B. M. Bolstad, F. Collin, L. M. Cope, B. Hobbs y T. P. Speed (2003). "Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data." *Nucleic Acids Res* **31**(4): e15.
- Ishii, D. N. (1989). "Relationship of insulin-like growth factor II gene expression in muscle to synaptogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(8): 2898-2902.
- Itoh, N. y D. M. Ornitz (2004). "Evolution of the Fgf and Fgfr gene families." *Trends Genet* **20**(11): 563-569.
- Itoh, N. y D. M. Ornitz (2011). "Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease." *J Biochem* **149**(2): 121-130.
- Iwanami, A., T. F. Cloughesy y P. S. Mischel (2009). "Striking the balance between PTEN and PDK1: it all depends on the cell context." *Genes Dev* **23**(15): 1699-1704.
- Iwano, T., A. Masuda, H. Kiyonari, H. Enomoto y F. Matsuzaki (2012). "Prox1 postmitotically defines dentate gyrus cells by specifying granule cell identity over CA3 pyramidal cell fate in the hippocampus." *Development* **139**(16): 3051-3062.
- Jang, M. H., M. A. Bonaguidi, Y. Kitabatake, J. Sun, J. Song, E. Kang, H. Jun, C. Zhong, Y. Su, J. U. Guo, M. X. Wang, K. A. Sailor, J. Y. Kim, Y. Gao, K. M. Christian, G. L. Ming y H. Song (2013). "Secreted frizzled-related protein 3 regulates activity-dependent adult hippocampal neurogenesis." *Cell Stem Cell* **12**(2): 215-223.
- Jin, K., Y. Sun, L. Xie, S. Batteur, X. O. Mao, C. Smelick, A. Logvinova y D. A. Greenberg (2003). "Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice." *Aging Cell* **2**(3): 175-183.
- Johe, K. K., T. G. Hazel, T. Muller, M. M. Dugich-Djordjevic y R. D. McKay (1996). "Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system." *Genes Dev* **10**(24): 3129-3140.
- Jones, K. R., I. Farinas, C. Backus y L. F. Reichardt (1994). "Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development." *Cell* **76**(6): 989-999.
- Jorissen, R. N., F. Walker, N. Pouliot, T. P. Garrett, C. W. Ward y A. W. Burgess (2003). "Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling." *Exp Cell Res* **284**(1): 31-53.
- Josephson, R., T. Müller, J. Pickel, S. Okabe, K. Reynolds, P. A. Turner, A. Zimmer y R. D. McKay (1998). "POU transcription factors control expression of CNS stem cell-specific genes." *Development* **125**(16): 3087-3100.
- Kakizawa, S., K. Yamada, M. Iino, M. Watanabe y M. Kano (2003). "Effects of insulin-like growth factor I on climbing fibre synapse elimination during cerebellar development." *Eur J Neurosci* **17**(3): 545-554.
- Kalluri, H. S., R. Vemuganti y R. J. Dempsey (2007). "Mechanism of insulin-like growth factor I-mediated proliferation of adult neural progenitor cells: role of Akt." *Eur J Neurosci* **25**(4): 1041-1048.
- Kandel, E. R., J. H. Schwartz, T. M. Jessell, S. A. Siegelbaum y A. J. Hudspeth (2013). "Principles of Neural Science, Fifth Edition." *McGraw-Hill*.
- Kaplan, M. S. y D. H. Bell (1984). "Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus." *J Neurosci* **4**(6): 1429-1441.
- Karalay, O., K. Doberauer, K. C. Vadodaria, M. Knobloch, L. Berti, A. Miquelajauregui, M. Schwark, R. Jagasia, M. M. Taketo, V. Tarabykin, D. C. Lie y S. Jessberger (2011). "Prospero-related homeobox 1 gene (Prox1) is regulated by canonical Wnt signaling and has a stage-specific role in adult hippocampal neurogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(14): 5807-5812.
- Katz, S. G., J. K. Fisher, M. Correll, R. T. Bronson, K. L. Ligon y L. D. Walensky (2012). "Brain and testicular tumors in mice with progenitor cells lacking BAX and BAK." *Oncogene*.

- Keilani, S., D. Healey y K. Sugaya (2012). "Reelin regulates differentiation of neural stem cells by activation of notch signaling through Disabled-1 tyrosine phosphorylation." Can J Physiol Pharmacol **90**(3): 361-369.
- Kelsch, W., C. P. Mosley, C. W. Lin y C. Lois (2007). "Distinct mammalian precursors are committed to generate neurons with defined dendritic projection patterns." PLoS Biol **5**(11): e300.
- Kempermann, G. (2012). "New neurons for 'survival of the fittest'." Nat Rev Neurosci **13**(10): 727-736.
- Kempermann, G., H. G. Kuhn y F. H. Gage (1997). "More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment." Nature **386**(6624): 493-495.
- Kharlamova, A. S., V. M. Barabanov y S. V. Savel'ev (2010). "Development of the olfactory bulbs in human fetuses (an immunohistochemical study)." Neurosci Behav Physiol **40**(2): 131-135.
- Kim, J. Y., X. Duan, C. Y. Liu, M.-H. Jang, J. U. Guo, N. P. anpongkul, E. Kang, H. Song y G. li Ming (2009). "DISC1 regulates new neuron development in the adult brain via modulation of AKT-mTOR signaling through KIAA1212." Neuron **63**(6): 761-773.
- Klein, R., L. F. Parada, F. Coulier y M. Barbacid (1989). "trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development." EMBO J **8**(12): 3701-3709.
- Kohwi, M., M. A. Petryniak, J. E. Long, M. Ekker, K. Obata, Y. Yanagawa, J. L. Rubenstein y A. Alvarez-Buylla (2007). "A subpopulation of olfactory bulb GABAergic interneurons is derived from Emx1- and Dlx5/6-expressing progenitors." J Neurosci **27**(26): 6878-6891.
- Kos, C. H. (2004). "Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models." Nutr Rev **62**(6 Pt 1): 243-246.
- Kosaka, T. y K. Kosaka (2008). "Heterogeneity of parvalbumin-containing neurons in the mouse main olfactory bulb, with special reference to short-axon cells and betaIV-spectrin positive dendritic segments." Neurosci Res **60**(1): 56-72.
- Kosaka, T. y K. Kosaka (2009). "Two types of tyrosine hydroxylase positive GABAergic juxtglomerular neurons in the mouse main olfactory bulb are different in their time of origin." Neurosci Res **64**(4): 436-441.
- Kouroupi, G., A. A. Lavdas, M. Gaitanou, D. Thomaidou, F. Stylianopoulou y R. Matsas (2010). "Lentivirus-mediated expression of insulin-like growth factor-I promotes neural stem/precursor cell proliferation and enhances their potential to generate neurons." J Neurochem **115**(2): 460-474.
- Kriegstein, A. y A. Alvarez-Buylla (2009). "The glial nature of embryonic and adult neural stem cells." Annu Rev Neurosci **32**: 149-184.
- Kuhn, H. G., J. Winkler, G. Kempermann, L. J. Thal y F. H. Gage (1997). "Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain." J Neurosci **17**(15): 5820-5829.
- Kuwabara, T., J. Hsieh, A. Muotri, G. Yeo, M. Warashina, D. C. Lie, L. Moore, K. Nakashima, M. Asashima y F. H. Gage (2009). "Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis." Nat Neurosci **12**(9): 1097-1105.
- Lai, W. T., V. Krishnappa y D. G. Phinney (2011). "Fibroblast growth factor 2 (Fgf2) inhibits differentiation of mesenchymal stem cells by inducing Twist2 and Spry4, blocking extracellular regulated kinase activation, and altering Fgf receptor expression levels." Stem Cells **29**(7): 1102-1111.
- Lamballe, F., R. J. Smeyne y M. Barbacid (1994). "Developmental expression of trkC, the neurotrophin-3 receptor, in the mammalian nervous system." J Neurosci **14**(1): 14-28.
- Larrayoz, I. M., L. Ochoa-Callejero, J. Garcia-Sanmartin, C. Vicario-Abejon y A. Martinez (2012). "Role of adrenomedullin in the growth and differentiation of stem and progenitor cells." Int Rev Cell Mol Biol **297**: 175-234.
- Laurino, L., X. X. Wang, B. A. de la Houssaye, L. Sosa, S. Dupraz, A. Caceres, K. H. Pfenninger y S. Quiroga (2005). "PI3K activation by IGF-1 is essential for the regulation of membrane expansion at the nerve growth cone." J Cell Sci **118**(Pt 16): 3653-3662.

- Lavado, A., O. V. Lagutin, L. M. L. Chow, S. J. Baker y G. Oliver (2010). "Prox1 is required for granule cell maturation and intermediate progenitor maintenance during brain neurogenesis." PLoS Biol **8**(8).
- Lazarini, F. y P. M. Lledo (2011). "Is adult neurogenesis essential for olfaction?" Trends Neurosci **34**(1): 20-30.
- Lecca, D., M. L. Trincavelli, P. Gelosa, L. Sironi, P. Ciana, M. Fumagalli, G. Villa, C. Verderio, C. Grumelli, U. Guerrini, E. Tremoli, P. Rosa, S. Cuboni, C. Martini, A. Buffo, M. Cimino y M. P. Abbracchio (2008). "The recently identified P2Y-like receptor GPR17 is a sensor of brain damage and a new target for brain repair." PLoS One **3**(10): e3579.
- Leibrock, J., F. Lottspeich, A. Hohn, M. Hofer, B. Hengerer, P. Masiakowski, H. Thoenen y Y. A. Barde (1989). "Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor." Nature **341**(6238): 149-152.
- Leon, Y., E. Vazquez, C. Sanz, J. A. Vega, J. M. Mato, F. Giraldez, J. Represa y I. Varela-Nieto (1995). "Insulin-like growth factor-I regulates cell proliferation in the developing inner ear, activating glycosyl-phosphatidylinositol hydrolysis and Fos expression." Endocrinology **136**(8): 3494-3503.
- Li, Y., Y. Komuro, J. K. Fahrion, T. Hu, N. Ohno, K. B. Fenner, J. Wooton, E. Raoult, L. Galas, D. Vaudry y H. Komuro (2012). "Light stimuli control neuronal migration by altering of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(7): 2630-2635.
- Li, Y., L. Shen, L. Cai, Q. Wang, W. Hou, F. Wang, Y. Zeng, G. Zhao, L. Yao y L. Xiong (2011). "Spatial-temporal expression of NDRG2 in rat brain after focal cerebral ischemia and reperfusion." Brain Res **1382**: 252-258.
- Liang, H., S. Hippenmeyer y H. T. Ghashghaei (2012). "A Nestin-cre transgenic mouse is insufficient for recombination in early embryonic neural progenitors." Biol Open **1**(12): 1200-1203.
- Lichtenwalner, R. J., M. E. Forbes, W. E. Sonntag y D. R. Riddle (2006). "Adult-onset deficiency in growth hormone and insulin-like growth factor-I decreases survival of dentate granule neurons: insights into the regulation of adult hippocampal neurogenesis." J Neurosci Res **83**(2): 199-210.
- Lillien, L. y H. Raphael (2000). "BMP and FGF regulate the development of EGF-responsive neural progenitor cells." Development **127**(22): 4993-5005.
- Lindberg, O. R., A. Persson, A. Brederlau, A. Shabro y H. G. Kuhn (2012). "EGF-induced expansion of migratory cells in the rostral migratory stream." PLoS One **7**(9): e46380.
- Liu, J. L., A. Grinberg, H. Westphal, B. Sauer, D. Accili, M. Karas y D. LeRoith (1998). "Insulin-like growth factor-I affects perinatal lethality and postnatal development in a gene dosage-dependent manner: manipulation using the Cre/loxP system in transgenic mice." Mol Endocrinol **12**(9): 1452-1462.
- Liu, J. P., J. Baker, A. S. Perkins, E. J. Robertson y A. Efstratiadis (1993). "Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r)." Cell **75**(1): 59-72.
- Liu, L., M. Shi, L. Wang, S. Hou, Z. Wu, G. Zhao y Y. Deng (2012). "Ndr2 expression in neurogenic germinal zones of embryonic and postnatal mouse brain." J Mol Histol **43**(1): 27-35.
- Liu, W., P. Ye, J. R. O'Kusky y A. J. D'Ercole (2009). "Type 1 insulin-like growth factor receptor signaling is essential for the development of the hippocampal formation and dentate gyrus." J Neurosci Res **87**(13): 2821-2832.
- Lo Sardo, V., C. Zuccato, G. Gaudenzi, B. Vitali, C. Ramos, M. Tartari, M. A. Myre, J. A. Walker, A. Pistocchi, L. Conti, M. Valenza, B. Drung, B. Schmidt, J. Gusella, S. Zeitlin, F. Cotelli y E. Cattaneo (2012). "An evolutionary recent neuroepithelial cell adhesion function of huntingtin implicates ADAM10-Ncadherin." Nat Neurosci **15**(5): 713-721.
- Lois, C. y A. Alvarez-Buylla (1993). "Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(5): 2074-2077.
- Long, J. E., S. Garel, M. J. Depew, S. Tobet y J. L. Rubenstein (2003). "DLX5 regulates development of peripheral and central components of the olfactory system." J Neurosci **23**(2): 568-578.

- Long, M. A. y F. M. V. Rossi (2009). "Silencing inhibits Cre-mediated recombination of the Z/AP and Z/EG reporters in adult cells." *PLoS One* **4**(5): e5435.
- Lopez-Mascaraque, L. y F. de Castro (2002). "The olfactory bulb as an independent developmental domain." *Cell Death Differ* **9**(12): 1279-1286.
- Lugert, S., M. Vogt, J. S. Tchorz, M. Muller, C. Giachino y V. Taylor (2012). "Homeostatic neurogenesis in the adult hippocampus does not involve amplification of Ascl1(high) intermediate progenitors." *Nat Commun* **3**: 670.
- Lukaszewicz, A., P. Savatier, V. Cortay, H. Kennedy y C. Dehay (2002). "Contrasting effects of basic fibroblast growth factor and neurotrophin 3 on cell cycle kinetics of mouse cortical stem cells." *J Neurosci* **22**(15): 6610-6622.
- Lyon, L., J. N. Kew, C. Corti, P. J. Harrison y P. W. Burnet (2008). "Altered hippocampal expression of glutamate receptors and transporters in GRM2 and GRM3 knockout mice." *Synapse* **62**(11): 842-850.
- Lledo, P. M., M. Alonso y M. S. Grubb (2006). "Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits." *Nat Rev Neurosci* **7**(3): 179-193.
- Lledo, P. M., F. T. Merkle y A. Alvarez-Buylla (2008). "Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity." *Trends Neurosci* **31**(8): 392-400.
- Llorens-Martin, M., A. Fuster-Matanzo, C. M. Teixeira, J. Jurado-Arjona, F. Ulloa, J. Defelipe, A. Rabano, F. Hernandez, E. Soriano y J. Avila (2013). "GSK-3beta overexpression causes reversible alterations on postsynaptic densities and dendritic morphology of hippocampal granule neurons in vivo." *Mol Psychiatry*.
- Llorens-Martín, M., I. Torres-Alemán y J. L. Trejo (2010). "Exercise modulates insulin-like growth factor 1-dependent and -independent effects on adult hippocampal neurogenesis and behaviour." *Mol Cell Neurosci* **44**(2): 109-117.
- Magarinos, M., M. R. Aburto, H. Sanchez-Calderon, C. Munoz-Agudo, U. R. Rapp y I. Varela-Nieto (2010). "RAF kinase activity regulates neuroepithelial cell proliferation and neuronal progenitor cell differentiation during early inner ear development." *PLoS One* **5**(12): e14435.
- Mairet-Coello, G., A. Tury y E. DiCicco-Bloom (2009). "Insulin-like growth factor-1 promotes G(1)/S cell cycle progression through bidirectional regulation of cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in developing rat cerebral cortex." *J Neurosci* **29**(3): 775-788.
- Malkovska, I., S. G. Kernie y L. F. Parada (2006). "Differential expression of the four untranslated BDNF exons in the adult mouse brain." *J Neurosci Res* **83**(2): 211-221.
- Manganas, L. N., X. Zhang, Y. Li, R. D. Hazel, S. D. Smith, M. E. Wagshul, F. Henn, H. Benveniste, P. M. Djuric, G. Enikolopov y M. Maletic-Savatic (2007). "Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain." *Science* **318**(5852): 980-985.
- Maric, D., A. Fiorio Pla, Y. H. Chang y J. L. Barker (2007). "Self-renewing and differentiating properties of cortical neural stem cells are selectively regulated by basic fibroblast growth factor (FGF) signaling via specific FGF receptors." *J Neurosci* **27**(8): 1836-1852.
- Martin, I., C. R. Andres, S. Vedrine, R. Tabagh, C. Michelle, M. L. Jourdan, N. Heuze-Vourc'h, P. Corcia, A. Duittoz y P. Vourc'h (2009). "Effect of the oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) on the expansion and neuronal differentiation of rat neural stem cells." *Brain Res* **1284**: 22-30.
- Martinez, A., S. Alcantara, V. Borrell, J. A. Del Rio, J. Blasi, R. Otal, N. Campos, A. Boronat, M. Barbacid, I. Silos-Santiago y E. Soriano (1998). "TrkB and TrkC signaling are required for maturation and synaptogenesis of hippocampal connections." *J Neurosci* **18**(18): 7336-7350.
- Marty, S., R. Wehrle y C. Sotelo (2000). "Neuronal activity and brain-derived neurotrophic factor regulate the density of inhibitory synapses in organotypic slice cultures of postnatal hippocampus." *J Neurosci* **20**(21): 8087-8095.
- Masilamoni, J. G., E. P. Jesudason, B. Baben, C. E. Jebaraj, S. Dhandayuthapani y R. Jayakumar (2006). "Molecular chaperone alpha-crystallin prevents detrimental effects of neuroinflammation." *Biochim Biophys Acta* **1762**(3): 284-293.

- Mason, I. (2007). "Initiation to end point: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development." *Nat Rev Neurosci* **8**(8): 583-596.
- Mast, T. G. y D. A. Fadool (2012). "Mature and precursor brain-derived neurotrophic factor have individual roles in the mouse olfactory bulb." *PLoS One* **7**(2): e31978.
- Matsumoto, A., I. Onoyama, T. Sunabori, R. Kageyama, H. Okano y K. I. Nakayama (2011). "Fbxw7-dependent degradation of Notch is required for control of "stemness" and neuronal-glia differentiation in neural stem cells." *J Biol Chem* **286**(15): 13754-13764.
- Matsutani, S. y N. Yamamoto (2004). "Brain-derived neurotrophic factor induces rapid morphological changes in dendritic spines of olfactory bulb granule cells in cultured slices through the modulation of glutamatergic signaling." *Neuroscience* **123**(3): 695-702.
- McAllister, A. K., L. C. Katz y D. C. Lo (1997). "Opposing roles for endogenous BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth." *Neuron* **18**(5): 767-778.
- McGinn, M. J., D. Sun, S. L. Schneider, J. K. Alexander y R. J. Colello (2004). "Epidermal growth factor-induced cell proliferation in the adult rat striatum." *Brain Res* **1007**(1-2): 29-38.
- McIntyre, J. C., W. B. Titlow y T. S. McClintock (2010). "Axon growth and guidance genes identify nascent, immature, and mature olfactory sensory neurons." *J Neurosci Res* **88**(15): 3243-3256.
- McKay, R. (1997). "Stem cells in the central nervous system." *Science* **276**(5309): 66-71.
- Mendez-Gomez, H. R., E. Vergano-Vera, J. L. Abad, A. Bulfone, R. Moratalla, F. de Pablo y C. Vicario-Abejon (2011). "The T-box brain 1 (Tbr1) transcription factor inhibits astrocyte formation in the olfactory bulb and regulates neural stem cell fate." *Mol Cell Neurosci* **46**(1): 108-121.
- Mendez-Gomez, H. R. y C. Vicario-Abejon (2012). "The homeobox gene *gsx2* regulates the self-renewal and differentiation of neural stem cells and the cell fate of postnatal progenitors." *PLoS One* **7**(1): e29799.
- Merkle, F. T., Z. Mirzadeh y A. Alvarez-Buylla (2007). "Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain." *Science* **317**(5836): 381-384.
- Ming, G. L. y H. Song (2011). "Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions." *Neuron* **70**(4): 687-702.
- Mira, H., Z. Andreu, H. Suh, D. C. Lie, S. Jessberger, A. Consiglio, J. S. Emeterio, R. Hortigüela, M. A. Marqués-Torrejón, K. Nakashima, D. Colak, M. Götz, I. Fariñas y F. H. Gage (2010). "Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus." *Cell Stem Cell* **7**(1): 78-89.
- Mirzadeh, Z., F. T. Merkle, M. Soriano-Navarro, J. M. Garcia-Verdugo y A. Alvarez-Buylla (2008). "Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain." *Cell Stem Cell* **3**(3): 265-278.
- Mishra, M., H. Akatsu y K. Heese (2011). "The novel protein MANI modulates neurogenesis and neurite-cone growth." *J Cell Mol Med* **15**(8): 1713-1725.
- Mizuguchi, R., H. Naritsuka, K. Mori y Y. Yoshihara (2012). "Tbr2 deficiency in mitral and tufted cells disrupts excitatory-inhibitory balance of neural circuitry in the mouse olfactory bulb." *J Neurosci* **32**(26): 8831-8844.
- Moreno-Estelles, M., P. Gonzalez-Gomez, R. Hortigüela, M. Diaz-Moreno, J. San Emeterio, A. L. Carvalho, I. Fariñas y H. Mira (2012). "Symmetric expansion of neural stem cells from the adult olfactory bulb is driven by astrocytes via WNT7A." *Stem Cells* **30**(12): 2796-2809.
- Mu, Y., S. W. Lee y F. H. Gage (2010). "Signaling in adult neurogenesis." *Curr Opin Neurobiol* **20**(4): 416-423.
- Mudo, G., N. Belluardo, A. Mauro y K. Fuxe (2007). "Acute intermittent nicotine treatment induces fibroblast growth factor-2 in the subventricular zone of the adult rat brain and enhances neuronal precursor cell proliferation." *Neuroscience* **145**(2): 470-483.

- Mudò, G., A. Bonomo, V. D. Liberto, M. Frinchi, K. Fuxe y N. Belluardo (2009). "The FGF-2/FGFRs neurotrophic system promotes neurogenesis in the adult brain." *J Neural Transm* **116**(8): 995-1005.
- Muller, A. P., A. M. Fernandez, C. Haas, E. Zimmer, L. V. Portela y I. Torres-Aleman (2012). "Reduced brain insulin-like growth factor I function during aging." *Mol Cell Neurosci* **49**(1): 9-12.
- Nelson, A. D., M. Suzuki y C. N. Svendsen (2008). "A high concentration of epidermal growth factor increases the growth and survival of neurogenic radial glial cells within human neurosphere cultures." *Stem Cells* **26**(2): 348-355.
- Nishijima, T., J. Piriz, S. Duflo, A. M. Fernandez, G. Gaitan, U. Gomez-Pinedo, J. M. Verdugo, F. Leroy, H. Soya, A. Nunez y I. Torres-Aleman (2010). "Neuronal activity drives localized blood-brain-barrier transport of serum insulin-like growth factor-I into the CNS." *Neuron* **67**(5): 834-846.
- Noctor, S. C., A. C. Flint, T. A. Weissman, R. S. Dammerman y A. R. Kriegstein (2001). "Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex." *Nature* **409**(6821): 714-720.
- Noctor, S. C., V. Martinez-Cerdeno, L. Ivic y A. R. Kriegstein (2004). "Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases." *Nat Neurosci* **7**(2): 136-144.
- Nolan, T., R. E. Hands y S. A. Bustin (2006). "Quantification of mRNA using real-time RT-PCR." *Nat Protoc* **1**(3): 1559-1582.
- O'Kusky, J. y P. Ye (2012). "Neurodevelopmental effects of insulin-like growth factor signaling." *Front Neuroendocrinol* **33**(3): 230-251.
- O'Kusky, J. R., P. Ye y A. J. D'Ercole (2000). "Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development." *J Neurosci* **20**(22): 8435-8442.
- Ogata, H., W. Fujibuchi, S. Goto y M. Kanehisa (2000). "A heuristic graph comparison algorithm and its application to detect functionally related enzyme clusters." *Nucleic Acids Res* **28**(20): 4021-4028.
- Ohlsson, C., C. Engdahl, A. E. Borjesson, S. H. Windahl, E. Studer, L. Westberg, E. Eriksson, A. Koskela, J. Tuukkanen, A. Krust, P. Chambon, H. Carlsten y M. K. Lagerquist (2012). "Estrogen receptor- α expression in neuronal cells affects bone mass." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(3): 983-988.
- Okabe, M., M. Ikawa, K. Kominami, T. Nakanishi y Y. Nishimune (1997). "'Green mice' as a source of ubiquitous green cells." *FEBS Lett* **407**(3): 313-319.
- Okuda, T., K. Kokame y T. Miyata (2008). "Differential expression patterns of NDRG family proteins in the central nervous system." *J Histochem Cytochem* **56**(2): 175-182.
- Onuma, T. A., Y. Ding, E. Abraham, Y. Zohar, H. Ando y C. Duan (2011). "Regulation of temporal and spatial organization of newborn GnRH neurons by IGF signaling in zebrafish." *J Neurosci* **31**(33): 11814-11824.
- Ory, D. S., B. A. Neugeboren y R. C. Mulligan (1996). "A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11400-11406.
- Otaegi, G., F. de Pablo, C. Vicario-Abejon y E. J. de la Rosa (2007). "Retinal and olfactory bulb precursor cells show distinct responses to FGF-2 and laminin." *Cell Biol Int* **31**(7): 752-758.
- Otaegi, G., M. J. Yusta-Boyo, E. Vergaño-Vera, H. R. Méndez-Gómez, A. C. Carrera, J. L. Abad, M. González, E. J. de la Rosa, C. Vicario-Abejón y F. de Pablo (2006). "Modulation of the PI 3-kinase-Akt signalling pathway by IGF-I and PTEN regulates the differentiation of neural stem/precursor cells." *J Cell Sci* **119**(Pt 13): 2739-2748.
- Ousman, S. S., B. H. Tomooka, J. M. van Noort, E. F. Wawrousek, K. C. O'Connor, D. A. Hafler, R. A. Sobel, W. H. Robinson y L. Steinman (2007). "Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination." *Nature* **448**(7152): 474-479.

- Overstreet-Wadiche, L. S. y G. L. Westbrook (2006). "Functional maturation of adult-generated granule cells." *Hippocampus* **16**(3): 208-215.
- Ozdinler, P. H. y J. D. Macklis (2006). "IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons." *Nat Neurosci* **9**(11): 1371-1381.
- Palazuelos, J., Z. Ortega, J. Diaz-Alonso, M. Guzman y I. Galve-Roperh (2012). "CB2 cannabinoid receptors promote neural progenitor cell proliferation via mTORC1 signaling." *J Biol Chem* **287**(2): 1198-1209.
- Paliouras, G. N., L. K. Hamilton, A. Aumont, S. E. Joppe, F. Barnabe-Heider y K. J. Fernandes (2012). "Mammalian target of rapamycin signaling is a key regulator of the transit-amplifying progenitor pool in the adult and aging forebrain." *J Neurosci* **32**(43): 15012-15026.
- Panchision, D. M., J. M. Pickel, L. Studer, S. H. Lee, P. A. Turner, T. G. Hazel y R. D. McKay (2001). "Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate." *Genes Dev* **15**(16): 2094-2110.
- Pappas, I. S. y J. G. Parnavelas (1997). "Neurotrophins and basic fibroblast growth factor induce the differentiation of calbindin-containing neurons in the cerebral cortex." *Exp Neurol* **144**(2): 302-314.
- Park, H. y M. M. Poo (2013). "Neurotrophin regulation of neural circuit development and function." *Nat Rev Neurosci* **14**(1): 7-23.
- Parrish-Aungst, S., M. T. Shipley, F. Erdelyi, G. Szabo y A. C. Puche (2007). "Quantitative analysis of neuronal diversity in the mouse olfactory bulb." *J Comp Neurol* **501**(6): 825-836.
- Pastrana, E., V. Silva-Vargas y F. Doetsch (2011). "Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells." *Cell Stem Cell* **8**(5): 486-498.
- Paves, H. y M. Saarma (1997). "Neurotrophins as in vitro growth cone guidance molecules for embryonic sensory neurons." *Cell Tissue Res* **290**(2): 285-297.
- Peltier, J., A. O'Neill y D. V. Schaffer (2007). "PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation." *Dev Neurobiol* **67**(10): 1348-1361.
- Perez-Martin, M., M. Cifuentes, J. M. Grondona, M. D. Lopez-Avalos, U. Gomez-Pinedo, J. M. Garcia-Verdugo y P. Fernandez-Llebrez (2010). "IGF-I stimulates neurogenesis in the hypothalamus of adult rats." *Eur J Neurosci* **31**(9): 1533-1548.
- Petridis, A. K. y A. El Maarouf (2011). "Brain-derived neurotrophic factor levels influence the balance of migration and differentiation of subventricular zone cells, but not guidance to the olfactory bulb." *J Clin Neurosci* **18**(2): 265-270.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* **29**(9): e45.
- Pichel, J. G., C. Fernández-Moreno, C. Vicario-Abejón, P. S. Testillano, P. H. Patterson y F. de Pablo (2003). "Developmental cooperation of leukemia inhibitory factor and insulin-like growth factor I in mice is tissue-specific and essential for lung maturation involving the transcription factors Sp3 and TTF-1." *Mech Dev* **120**(3): 349-361.
- Poe, B. H., C. Linville, D. R. Riddle, W. E. Sonntag y J. K. Brunso-Bechtold (2001). "Effects of age and insulin-like growth factor-1 on neuron and synapse numbers in area CA3 of hippocampus." *Neuroscience* **107**(2): 231-238.
- Popken, G. J., R. D. Hodge, P. Ye, J. Zhang, W. Ng, J. R. O'Kusky y A. J. D'Ercole (2004). "In vivo effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on prenatal and early postnatal development of the central nervous system." *Eur J Neurosci* **19**(8): 2056-2068.
- Powell-Braxton, L., P. Hollingshead, C. Warburton, M. Dowd, S. Pitts-Meek, D. Dalton, N. Gillett y T. A. Stewart (1993). "IGF-I is required for normal embryonic growth in mice." *Genes Dev* **7**(12B): 2609-2617.
- Puche, J. E. y I. Castilla-Cortazar (2012). "Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency." *J Transl Med* **10**(1): 224.

- Puglianiello, A., D. Germani, P. Rossi y S. Cianfarani (2000). "IGF-I stimulates chemotaxis of human neuroblasts. Involvement of type 1 IGF receptor, IGF binding proteins, phosphatidylinositol-3 kinase pathway and plasmin system." *J Endocrinol* **165**(1): 123-131.
- Pun, R. Y., I. J. Rolle, C. L. Lasarge, B. E. Hosford, J. M. Rosen, J. D. Uhl, S. N. Schmeltzer, C. Faulkner, S. L. Bronson, B. L. Murphy, D. A. Richards, K. D. Holland y S. C. Danzer (2012). "Excessive activation of mTOR in postnatally generated granule cells is sufficient to cause epilepsy." *Neuron* **75**(6): 1022-1034.
- Qian, X., Q. Shen, S. K. Goderie, W. He, A. Capela, A. A. Davis y S. Temple (2000). "Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells." *Neuron* **28**(1): 69-80.
- Quiñones-Hinojosa, A., N. Sanai, M. Soriano-Navarro, O. Gonzalez-Perez, Z. Mirzadeh, S. Gil-Perotin, R. Romero-Rodriguez, M. S. Berger, J. M. Garcia-Verdugo y A. Alvarez-Buylla (2006). "Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells." *J Comp Neurol* **494**(3): 415-434.
- Raballo, R., J. Rhee, R. Lyn-Cook, J. F. Leckman, M. L. Schwartz y F. M. Vaccarino (2000). "Basic fibroblast growth factor (Fgf2) is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex." *J Neurosci* **20**(13): 5012-5023.
- Rando, T. A. (2006). "Stem cells, ageing and the quest for immortality." *Nature* **441**(7097): 1080-1086.
- Ray, J., D. A. Peterson, M. Schinstine y F. H. Gage (1993). "Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(8): 3602-3606.
- Reichardt, L. F. (2006). "Neurotrophin-regulated signalling pathways." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**(1473): 1545-1564.
- Ren, H., I. J. Orozco, Y. Su, S. Suyama, R. Gutierrez-Juarez, T. L. Horvath, S. L. Wardlaw, L. Plum, O. Arancio y D. Accili (2012). "FoxO1 Target Gpr17 Activates AgRP Neurons to Regulate Food Intake." *Cell* **149**(6): 1314-1326.
- Reynolds, B. A. y S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." *Science* **255**(5052): 1707-1710.
- Reynolds, B. A. y S. Weiss (1996). "Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell." *Dev Biol* **175**(1): 1-13.
- Rico, B., B. Xu y L. F. Reichardt (2002). "TrkB receptor signaling is required for establishment of GABAergic synapses in the cerebellum." *Nat Neurosci* **5**(3): 225-233.
- Román-Trufero, M., H. R. Méndez-Gómez, C. Pérez, A. Hijikata, Y. ichi Fujimura, T. Endo, H. Koseki, C. Vicario-Abejón y M. Vidal (2009). "Maintenance of undifferentiated state and self-renewal of embryonic neural stem cells by Polycomb protein Ring1B." *Stem Cells* **27**(7): 1559-1570.
- Rotwein, P., S. K. Burgess, J. D. Milbrandt y J. E. Krause (1988). "Differential expression of insulin-like growth factor genes in rat central nervous system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(1): 265-269.
- Roybon, L., T. Hjalt, S. Stott, F. Guillemot, J.-Y. Li y P. Brundin (2009). "Neurogenin2 directs granule neuroblast production and amplification while NeuroD1 specifies neuronal fate during hippocampal neurogenesis." *PLoS One* **4**(3): e4779.
- Russo, V. C., P. D. Gluckman, E. L. Feldman y G. A. Werther (2005). "The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain." *Endocr Rev* **26**(7): 916-943.
- Sairanen, M., G. Lucas, P. Ernfors, M. Castren y E. Castren (2005). "Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus." *J Neurosci* **25**(5): 1089-1094.
- Salih, D. A., A. J. Rashid, D. Colas, L. de la Torre-Ubieta, R. P. Zhu, A. A. Morgan, E. E. Santo, D. Ucar, K. Devarajan, C. J. Cole, D. V. Madison, M. Shamloo, A. J. Butte, A. Bonni, S. A. Josselyn y A. Brunet (2012). "FoxO6 regulates memory consolidation and synaptic function." *Genes Dev* **26**(24): 2780-2801.
- Sanai, N., M. S. Berger, J. M. Garcia-Verdugo y A. Alvarez-Buylla (2007). "Comment on "Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension"." *Science* **318**(5849): 393; author reply 393.

- Sanai, N., T. Nguyen, R. A. Ihrie, Z. Mirzadeh, H. H. Tsai, M. Wong, N. Gupta, M. S. Berger, E. Huang, J. M. Garcia-Verdugo, D. H. Rowitch y A. Alvarez-Buylla (2011). "Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy." Nature **478**(7369): 382-386.
- Sanai, N., A. D. Tramontin, A. Quinones-Hinojosa, N. M. Barbaro, N. Gupta, S. Kunwar, M. T. Lawton, M. W. McDermott, A. T. Parsa, J. Manuel-Garcia Verdugo, M. S. Berger y A. Alvarez-Buylla (2004). "Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration." Nature **427**(6976): 740-744.
- Sanchez-Huertas, C. y B. Rico (2011). "CREB-Dependent Regulation of GAD65 Transcription by BDNF/TrkB in Cortical Interneurons." Cereb Cortex **21**(4): 777-788.
- Sanchez, A. L., B. J. Matthews, M. M. Meynard, B. Hu, S. Javed y S. Cohen Cory (2006). "BDNF increases synapse density in dendrites of developing tectal neurons in vivo." Development **133**(13): 2477-2486.
- Scolnick, J. A., K. Cui, C. D. Duggan, S. Xuan, X.-B. Yuan, A. Efstratiadis y J. Ngai (2008). "Role of IGF signaling in olfactory sensory map formation and axon guidance." Neuron **57**(6): 847-857.
- Schmidt, H. (2012). "Three functional facets of calbindin D-28k." Front Mol Neurosci **5**: 25.
- Segal, R. A., S. L. Pomeroy y C. D. Stiles (1995). "Axonal growth and fasciculation linked to differential expression of BDNF and NT3 receptors in developing cerebellar granule cells." J Neurosci **15**(7 Pt 1): 4970-4981.
- Shao, W., S. Z. Zhang, M. Tang, X. H. Zhang, Z. Zhou, Y. Q. Yin, Q. B. Zhou, Y. Y. Huang, Y. J. Liu, E. Wawrousek, T. Chen, S. B. Li, M. Xu, J. N. Zhou, G. Hu y J. W. Zhou (2013). "Suppression of neuroinflammation by astrocytic dopamine D2 receptors via alphaB-crystallin." Nature **494**(7435): 90-94.
- Shelly, M., L. Cancedda, S. Heilshorn, G. Sumbre y M. M. Poo (2007). "LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization." Cell **129**(3): 565-577.
- Shen, K. y P. Scheiffele (2010). "Genetics and cell biology of building specific synaptic connectivity." Annu Rev Neurosci **33**: 473-507.
- Shetty, A. K. (2004). "Progenitor cells from the CA3 region of the embryonic day 19 rat hippocampus generate region-specific neuronal phenotypes in vitro." Hippocampus **14**(5): 595-614.
- Shetty, A. K., M. S. Rao, B. Hattiangady, V. Zaman y G. A. Shetty (2004). "Hippocampal neurotrophin levels after injury: Relationship to the age of the hippocampus at the time of injury." J Neurosci Res **78**(4): 520-532.
- Shetty, A. K. y D. A. Turner (1998). "In vitro survival and differentiation of neurons derived from epidermal growth factor-responsive postnatal hippocampal stem cells: inducing effects of brain-derived neurotrophic factor." J Neurobiol **35**(4): 395-425.
- Sierra, A., J. M. Encinas, J. J. P. Deudero, J. H. Chancey, G. Enikolopov, L. S. Overstreet-Wadiche, S. E. Tsirka y M. Maletic-Savatic (2010). "Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis." Cell Stem Cell **7**(4): 483-495.
- Singh, B., C. Henneberger, D. Betances, M. A. Arevalo, A. Rodriguez-Tebar, J. C. Meier y R. Grantyn (2006). "Altered balance of glutamatergic/GABAergic synaptic input and associated changes in dendrite morphology after BDNF expression in BDNF-deficient hippocampal neurons." J Neurosci **26**(27): 7189-7200.
- Song, J., K. M. Christian, G. L. Ming y H. Song (2012). "Modification of hippocampal circuitry by adult neurogenesis." Dev Neurobiol **72**(7): 1032-1043.
- Soriano, E., J. A. Del Rio, A. Martinez y H. Super (1994). "Organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. I. Immunocytochemical characterization of neuronal populations in the subplate and marginal zone." J Comp Neurol **342**(4): 571-595.
- Sosa, L., S. Dupraz, L. Laurino, F. Bollati, M. Bisbal, A. Caceres, K. H. Pfenninger y S. Quiroga (2006). "IGF-1 receptor is essential for the establishment of hippocampal neuronal polarity." Nat Neurosci **9**(8): 993-995.

- Srinivas, S., T. Watanabe, C. S. Lin, C. M. William, Y. Tanabe, T. M. Jessell y F. Costantini (2001). "Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus." *BMC Dev Biol* **1**: 4.
- Stefaniuk, M., L. Swiech, J. Dzwonek y K. Lukasiuk (2010). "Expression of Ttyh1, a member of the Tweety family in neurons in vitro and in vivo and its potential role in brain pathology." *J Neurochem* **115**(5): 1183-1194.
- Stratikopoulos, E., M. Szabolcs, I. Dragatsis, A. Klinakis y A. Efstratiadis (2008). "The hormonal action of IGF1 in postnatal mouse growth." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(49): 19378-19383.
- Suh, H., A. Consiglio, J. Ray, T. Sawai, K. A. D'Amour y F. H. Gage (2007). "In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus." *Cell Stem Cell* **1**(5): 515-528.
- Suh, H., W. Deng y F. H. Gage (2009). "Signaling in adult neurogenesis." *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**: 253-275.
- Sun, W., H. Kim y Y. Moon (2010). "Control of neuronal migration through rostral migration stream in mice." *Anat Cell Biol* **43**(4): 269-279.
- Sun, Y., J. Hu, L. Zhou, S. M. Pollard y A. Smith (2011). "Interplay between FGF2 and BMP controls the self-renewal, dormancy and differentiation of rat neural stem cells." *J Cell Sci* **124**(Pt 11): 1867-1877.
- Tanaka, R., M. Tainaka, T. Ota, N. Mizuguchi, H. Kato, S. Urabe, Y. Chen, J. M. Fustin, Y. Yamaguchi, M. Doi, S. Hamada y H. Okamura (2011). "Accurate determination of S-phase fraction in proliferative cells by dual fluorescence and peroxidase immunohistochemistry with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) and Ki67 antibodies." *J Histochem Cytochem* **59**(8): 791-798.
- Taniguchi, H., D. Kawauchi, K. Nishida y F. Murakami (2006). "Classic cadherins regulate tangential migration of precerebellar neurons in the caudal hindbrain." *Development* **133**(10): 1923-1931.
- Taupin, P. y F. H. Gage (2002). "Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals." *J Neurosci Res* **69**(6): 745-749.
- Taupin, P., J. Ray, W. H. Fischer, S. T. Suhr, K. Hakansson, A. Grubb y F. H. Gage (2000). "FGF-2-responsive neural stem cell proliferation requires CCg, a novel autocrine/paracrine cofactor." *Neuron* **28**(2): 385-397.
- Teixeira, C. M., M. M. Kron, N. Masachs, H. Zhang, D. C. Lagace, A. Martinez, I. Reillo, X. Duan, C. Bosch, L. Pujadas, L. Brunso, H. Song, A. J. Eisch, V. Borrell, B. W. Howell, J. M. Parent y E. Soriano (2012). "Cell-autonomous inactivation of the reelin pathway impairs adult neurogenesis in the hippocampus." *J Neurosci* **32**(35): 12051-12065.
- Temple, S. (2001). "The development of neural stem cells." *Nature* **414**(6859): 112-117.
- Tepavcevic, V., F. Lazarini, C. Alfaro-Cervello, C. Kerninon, K. Yoshikawa, J. M. Garcia-Verdugo, P. M. Lledo, B. Nait-Oumesmar y A. Baron-Van Evercooren (2011). "Inflammation-induced subventricular zone dysfunction leads to olfactory deficits in a targeted mouse model of multiple sclerosis." *J Clin Invest* **121**(12): 4722-4734.
- Thier, M., P. Worsdorfer, Y. B. Lakes, R. Gorris, S. Herms, T. Opitz, D. Seiferling, T. Quandt, P. Hoffmann, M. M. Nothen, O. Brustle y F. Edenhofer (2012). "Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells." *Cell Stem Cell* **10**(4): 473-479.
- Trejo, J. L., E. Carro y I. Torres-Aleman (2001). "Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus." *J Neurosci* **21**(5): 1628-1634.
- Trejo, J. L., M. V. Llorens-Martín y I. Torres-Alemán (2008). "The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis." *Mol Cell Neurosci* **37**(2): 402-411.
- Trejo, J. L., J. Piriz, M. V. Llorens-Martín, A. M. Fernández, M. Bolós, D. LeRoith, A. Nuñez y I. Torres-Aleman (2007). "Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its pro-cognitive effects." *Mol Psychiatry* **12**(12): 1118-1128.

- Tronche, F., C. Kellendonk, O. Kretz, P. Gass, K. Anlag, P. C. Orban, R. Bock, R. Klein y G. Schütz (1999). "Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety." Nat Genet **23**(1): 99-103.
- Tucker, K. L., M. Meyer y Y. A. Barde (2001). "Neurotrophins are required for nerve growth during development." Nat Neurosci **4**(1): 29-37.
- Tyler, W. J. y L. D. Pozzo-Miller (2001). "BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses." J Neurosci **21**(12): 4249-4258.
- Ultsch, M. H., C. Wiesmann, L. C. Simmons, J. Henrich, M. Yang, D. Reilly, S. H. Bass y A. M. de Vos (1999). "Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC." J Mol Biol **290**(1): 149-159.
- Urfer, R., P. Tsoulfas, L. O'Connell, J. A. Hongo, W. Zhao y L. G. Presta (1998). "High resolution mapping of the binding site of TrkA for nerve growth factor and TrkC for neurotrophin-3 on the second immunoglobulin-like domain of the Trk receptors." J Biol Chem **273**(10): 5829-5840.
- Vaccarino, F. M., M. L. Schwartz, R. Raballo, J. Nilsen, J. Rhee, M. Zhou, T. Doetschman, J. D. Coffin, J. J. Wyland y Y. T. Hung (1999). "Changes in cerebral cortex size are governed by fibroblast growth factor during embryogenesis." Nat Neurosci **2**(3): 246-253.
- Valenciano, A. I., S. Corrochano, F. de Pablo, P. de la Villa y E. J. de la Rosa (2006). "Proinsulin/insulin is synthesized locally and prevents caspase- and cathepsin-mediated cell death in the embryonic mouse retina." J Neurochem **99**(2): 524-536.
- van Duyvenvoorde, H. A., P. A. van Setten, M. J. Walenkamp, J. van Doorn, J. Koenig, L. Gauguin, W. Oostdijk, C. A. Ruivenkamp, M. Losekoot, J. D. Wade, P. De Meyts, M. Karperien, C. Noordam y J. M. Wit (2010). "Short stature associated with a novel heterozygous mutation in the insulin-like growth factor 1 gene." J Clin Endocrinol Metab **95**(11): E363-367.
- van Praag, H., B. R. Christie, T. J. Sejnowski y F. H. Gage (1999). "Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13427-13431.
- van Praag, H., A. F. Schinder, B. R. Christie, N. Toni, T. D. Palmer y F. H. Gage (2002). "Functional neurogenesis in the adult hippocampus." Nature **415**(6875): 1030-1034.
- Vergaño-Vera, E., A. P. Fernández, A. Hurtado-Chong, C. Vicario-Abejón y A. Martínez (2010). "Lack of adrenomedullin affects growth and differentiation of adult neural stem/progenitor cells." Cell Tissue Res **340**(1): 1-11.
- Vergaño-Vera, E., H. R. Méndez-Gómez, A. Hurtado-Chong, J. C. Cigudosa y C. Vicario-Abejón (2009). "Fibroblast growth factor-2 increases the expression of neurogenic genes and promotes the migration and differentiation of neurons derived from transplanted neural stem/progenitor cells." Neuroscience **162**(1): 39-54.
- Vergaño-Vera, E., M. J. Yusta-Boyo, F. de Castro, A. Bernad, F. de Pablo y C. Vicario-Abejón (2006). "Generation of GABAergic and dopaminergic interneurons from endogenous embryonic olfactory bulb precursor cells." Development **133**(21): 4367-4379.
- Vescovi, A. L., B. A. Reynolds, D. D. Fraser y S. Weiss (1993). "bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells." Neuron **11**(5): 951-966.
- Vicario-Abejón, C., C. Collin, R. D. McKay y M. Segal (1998). "Neurotrophins induce formation of functional excitatory and inhibitory synapses between cultured hippocampal neurons." J Neurosci **18**(18): 7256-7271.
- Vicario-Abejón, C., C. Collin, P. Tsoulfas y R. D. McKay (2000). "Hippocampal stem cells differentiate into excitatory and inhibitory neurons." Eur J Neurosci **12**(2): 677-688.
- Vicario-Abejón, C., C. Fernandez-Moreno, J. G. Pichel y F. de Pablo (2004). "Mice lacking IGF-I and LIF have motoneuron deficits in brain stem nuclei." Neuroreport **15**(18): 2769-2772.
- Vicario-Abejón, C., K. K. Johe, T. G. Hazel, D. Collazo y R. D. McKay (1995). "Functions of basic fibroblast growth factor and neurotrophins in the differentiation of hippocampal neurons." Neuron **15**(1): 105-114.

- Vicario-Abejón, C., D. Owens, R. McKay y M. Segal (2002). "Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization." *Nat Rev Neurosci* **3**(12): 965-974.
- Vicario-Abejón, C., M. J. Yusta-Boyo, C. Fernández-Moreno y F. de Pablo (2003). "Locally born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related factors and require endogenous insulin-like growth factor-I for differentiation into neurons and glia." *J Neurosci* **23**(3): 895-906.
- Wagner, J. P., I. B. Black y E. DiCicco-Bloom (1999). "Stimulation of neonatal and adult brain neurogenesis by subcutaneous injection of basic fibroblast growth factor." *J Neurosci* **19**(14): 6006-6016.
- Walther, C. y P. Gruss (1991). "Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS." *Development* **113**(4): 1435-1449.
- Wang, C., F. Liu, Y. Y. Liu, C. H. Zhao, Y. You, L. Wang, J. Zhang, B. Wei, T. Ma, Q. Zhang, Y. Zhang, R. Chen, H. Song y Z. Yang (2011). "Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain." *Cell Res* **21**(11): 1534-1550.
- Wang, J., J. Zhou, L. Powell-Braxton y C. Bondy (1999). "Effects of Igf1 gene deletion on postnatal growth patterns." *Endocrinology* **140**(7): 3391-3394.
- Waterhouse, E. G., J. J. An, L. L. Orefice, M. Baydyuk, G. Y. Liao, K. Zheng, B. Lu y B. Xu (2012). "BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission." *J Neurosci* **32**(41): 14318-14330.
- Weickert, C. S., M. J. Webster, S. M. Colvin, M. M. Herman, T. M. Hyde, D. R. Weinberger y J. E. Kleinman (2000). "Localization of epidermal growth factor receptors and putative neuroblasts in human subependymal zone." *J Comp Neurol* **423**(3): 359-372.
- Weinandy, F., J. Ninkovic y M. Götz (2011). "Restrictions in time and space--new insights into generation of specific neuronal subtypes in the adult mammalian brain." *Eur J Neurosci* **33**(6): 1045-1054.
- Wichterle, H., J. M. Garcia-Verdugo y A. Alvarez-Buylla (1997). "Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration." *Neuron* **18**(5): 779-791.
- Wingerd, K. L., N. L. Goodman, S. T. Leu y D. O. Clegg (2004). "Expression and function of integrin alpha4beta1 and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) during sympathetic innervation of the heart." *Dev Dyn* **231**(2): 359-369.
- Winpenny, E., M. Lebel-Potter, M. E. Fernandez, M. S. Brill, M. Gotz, F. Guillemot y O. Raineteau (2011). "Sequential generation of olfactory bulb glutamatergic neurons by Neurog2-expressing precursor cells." *Neural Dev* **6**: 12.
- Wong, R. W. y L. Guillaud (2004). "The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS." *Cytokine Growth Factor Rev* **15**(2-3): 147-156.
- Wu, Y., H. Sun, S. Yakar y D. LeRoith (2009). "Elevated levels of insulin-like growth factor (IGF)-I in serum rescue the severe growth retardation of IGF-I null mice." *Endocrinology* **150**(9): 4395-4403.
- Xiang, Y., N. Ding, Z. Xing, W. Zhang, H. Liu y Z. Li (2011). "Insulin-like growth factor-1 regulates neurite outgrowth and neuronal migration from organotypic cultured dorsal root ganglion." *Int J Neurosci* **121**(2): 101-106.
- Yakar, S., C. J. Rosen, W. G. Beamer, C. L. Ackert-Bicknell, Y. Wu, J.-L. Liu, G. T. Ooi, J. Setser, J. Frystyk, Y. R. Boisclair y D. LeRoith (2002). "Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density." *J Clin Invest* **110**(6): 771-781.
- Yamada, M., T. Ikeuchi y H. Hatanaka (1997). "The neurotrophic action and signalling of epidermal growth factor." *Prog Neurobiol* **51**(1): 19-37.
- Yamada, M. K., K. Nakanishi, S. Ohba, T. Nakamura, Y. Ikegaya, N. Nishiyama y N. Matsuki (2002). "Brain-derived neurotrophic factor promotes the maturation of GABAergic mechanisms in cultured hippocampal neurons." *J Neurosci* **22**(17): 7580-7585.

- Yan, Y., X. Li y P. Ye (2013). "IGF-I-induced phosphorylation of CREB participates in the stimulation of cyclin D1 transcription." Dev Neurobiol.
- Ye, P. y A. J. D'Ercole (2006). "Insulin-like growth factor actions during development of neural stem cells and progenitors in the central nervous system." J Neurosci Res **83**(1): 1-6.
- Ye, P., Y. Umayahara, D. Ritter, T. Bunting, H. Auman, P. Rotwein y A. J. D'Ercole (1997). "Regulation of insulin-like growth factor I (IGF-I) gene expression in brain of transgenic mice expressing an IGF-I-luciferase fusion gene." Endocrinology **138**(12): 5466-5475.
- Yoo, Y. D., C. T. Huang, X. Zhang, T. M. Lavaute y S. C. Zhang (2011). "Fibroblast growth factor regulates human neuroectoderm specification through ERK1/2-PARP-1 pathway." Stem Cells **29**(12): 1975-1982.
- Young, K. M., T. Mitsumori, N. Pringle, M. Grist, N. Kessaris y W. D. Richardson (2010). "An Fgfr3-iCreER(T2) transgenic mouse line for studies of neural stem cells and astrocytes." Glia **58**(8): 943-953.
- Yuan, X. B., M. Jin, X. Xu, Y. Q. Song, C. P. Wu, M. M. Poo y S. Duan (2003). "Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance." Nat Cell Biol **5**(1): 38-45.
- Zechel, S., S. Werner, K. Unsicker y O. von Bohlen und Halbach (2010). "Expression and functions of fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in hippocampal formation." Neuroscientist **16**(4): 357-373.
- Zhang, J., W. Liu, P. Ye y A. J. D'Ercole (2007). "Pitfalls of PCR-based strategy for genotyping cre-loxP mice." Biotechniques **42**(3): 281, 283.
- Zhang, L. I. y M. M. Poo (2001). "Electrical activity and development of neural circuits." Nat Neurosci **4 Suppl**: 1207-1214.
- Zhang, X. Y., C. Chen da, M. H. Xiu, C. N. Haile, X. Luo, K. Xu, H. P. Zhang, L. Zuo, Z. Zhang, X. Zhang, T. A. Kosten y T. R. Kosten (2012). "Cognitive and serum BDNF correlates of BDNF Val66Met gene polymorphism in patients with schizophrenia and normal controls." Hum Genet **131**(7): 1187-1195.
- Zhao, C., W. Deng y F. H. Gage (2008). "Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis." Cell **132**(4): 645-660.
- Zhao, C., E. M. Teng, R. G. Summers, G.-L. Ming y F. H. Gage (2006). "Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus." J Neurosci **26**(1): 3-11.
- Zheng, W., R. S. Nowakowski y F. M. Vaccarino (2004). "Fibroblast growth factor 2 is required for maintaining the neural stem cell pool in the mouse brain subventricular zone." Dev Neurosci **26**(2-4): 181-196.
- Zhou, M., W. Li, S. Huang, J. Song, J. Y. Kim, X. Tian, E. Kang, Y. Sano, C. Liu, J. Balaji, S. Wu, Y. Zhou, S. N. Parivash, D. Ehninger, L. He, H. Song, G. L. Ming y A. J. Silva (2013). "mTOR Inhibition Ameliorates Cognitive and Affective Deficits Caused by Disc1 Knockdown in Adult-Born Dentate Granule Neurons." Neuron **77**(4): 647-654.
- Zigova, T., V. Pencea, S. J. Wiegand y M. B. Luskin (1998). "Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb." Mol Cell Neurosci **11**(4): 234-245.
- Zimmerman, L., B. Parr, U. Lendahl, M. Cunningham, R. McKay, B. Gavin, J. Mann, G. Vassileva y A. McMahon (1994). "Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors." Neuron **12**(1): 11-24.

Anexo

1. Artículos publicados

- *A global transcriptome analysis reveals molecular hallmarks of neural stem cell death, survival, and differentiation in response to partial FGF-2 and EGF deprivation.* Nieto-Estevez, V., J. Pignatelli, M. J. Arauzo-Bravo, A. Hurtado-Chong y C. Vicario-Abejon. PLoS One 2013. **8**(1): e53594.
- *The regulation of olfactory bulb neurogenesis by the activity of transcription factors and growth factors.* Diaz-Guerra, E., Pignatelli, J., Nieto-Estevez, V., and Vicario-Abejon, C. Aceptado para su publicación en The Anatomical Record .